

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/62, 15/31, 15/40, 1/21, C07K 13/00, A61K 39/12, 39/108, G01N 33/569		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/14967
			(43) Date de publication internationale: 7 juillet 1994 (07.07.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/01281		(81) Etats désignés: AU, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 21 décembre 1993 (21.12.93)		Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: 92/15464 22 décembre 1992 (22.12.92) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75431 Paris Cédex 07 (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GIRARDEAU, Jean-Pierre [FR/FR]; Pardon, F-63122 Saint-Genes Champanelle (FR). MARTIN, Christine [FR/FR]; Impasse du Panicaud, F-63670 La Roche-Blanche (FR). MECHIN, Marie-Claire [FR/FR]; 20, rue René-Brut, Résidence "Le Sancy", F-63110 Beaumont (FR). DER VARTANIAN, Maurice [FR/FR]; Berset, F-63122 Saint-Genes-Champanelle (FR). BOUSQUET, François [FR/FR]; 1, avenue de Baulieu, F-63122 Ceyrat (FR).			
(74) Mandataire: BREESE, Pierre; Breese - Majerowicz, CNIT - WTC 2, Boite postale 434, F-92053 Paris-La Defense (FR).			
(54) Title: CS31A PROTEIN CAPSULE SUBUNIT MODIFIED BY AT LEAST ONE HETEROLOGOUS PEPTIDE, CS31A PROTEIN CAPSULE COMPRISING SAID SUBUNIT, MICRO-ORGANISMS HAVING SUCH SUBUNITS ON THEIR OUTER MEMBRANE, AND METHODS FOR PREPARING AND USING SAME			
(54) Titre: SOUS-UNITÉ D'UNE CAPSULE PROTEIQUE CS31A MODIFIÉE PAR AU MOINS UN PEPTIDE HÉTÉROLOGUE, CAPSULE PROTEIQUE CS31A COMPORTANT UNE TELLE SOUS-UNITÉ ET MICRO-ORGANISMES DONT LA MEMBRANE EXTERNE PORTE DE TELLES SOUS-UNITÉS; PROCÉDES D'OBTENTION ET UTILISATION DE CEUX-CI			
(57) Abstract			
<p>A CS31A protein capsule subunit having an aminoacid sequence modified by at least one heterologous peptide, the CS31A protein capsule comprising said subunit, and micro-organisms having the CS31A protein capsule with its subunit aminoacid sequence modified by at least one heterologous peptide, are disclosed. Methods for preparing said subunits, CS31A protein capsules comprising same, and micro-organisms having CS31A protein capsules, as well as the use thereof for preparing vaccines, producing peptides and preparing immunoassays, are also disclosed.</p>			
(57) Abrégé			
<p>La présente invention concerne la sous-unité de la capsule protéique CS31A dont la séquence en acides aminés est modifiée par au moins un peptide hétérologue, ainsi que la capsule protéique CS31A comportant une telle sous-unité et les micro-organismes qui portent une capsule protéique CS31A dont la séquence en acides aminés de la sous-unité est modifiée par au moins un peptide hétérologue. L'invention concerne aussi les procédés d'obtention de telles sous-unités, des capsules protéiques CS31A les comportant et des micro-organismes qui portent ces capsules protéiques CS31A, ainsi que l'utilisation de ceux-ci pour la préparation de vaccins, la production de peptides et la préparation de tests immunologiques.</p>			
<pre> 1 ATG GGT GCA GTT GAT ATT GAT GGT GCA 2 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 3 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 4 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 5 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 6 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 7 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 8 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 9 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 10 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 11 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 12 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 13 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 14 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 15 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 16 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 17 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 18 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 19 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 20 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 21 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 22 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 23 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 24 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 25 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 26 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 27 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 28 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 29 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 30 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 31 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 32 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 33 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 34 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 35 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 36 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 37 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 38 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 39 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 40 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 41 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 42 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 43 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 44 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 45 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 46 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 47 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 48 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 49 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 50 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 51 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 52 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 53 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 54 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 55 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 56 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 57 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 58 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 59 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 60 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 61 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 62 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 63 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 64 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 65 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 66 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 67 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 68 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 69 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 70 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 71 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 72 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 73 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 74 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 75 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 76 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 77 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 78 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 79 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 80 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 81 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 82 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 83 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 84 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 85 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 86 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 87 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 88 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 89 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 90 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 91 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 92 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 93 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 94 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 95 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 96 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 97 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 98 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 99 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 100 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 101 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 102 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 103 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 104 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 105 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 106 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 107 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 108 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 109 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 110 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 111 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 112 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 113 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 114 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 115 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 116 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 117 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 118 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 119 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 120 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 121 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 122 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 123 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 124 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 125 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 126 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 127 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 128 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 129 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 130 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 131 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 132 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 133 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 134 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 135 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 136 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 137 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 138 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 139 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 140 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 141 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 142 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 143 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 144 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 145 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 146 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 147 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 148 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 149 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 150 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 151 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 152 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 153 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 154 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 155 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 156 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 157 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 158 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 159 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 160 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 161 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 162 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 163 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 164 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 165 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 166 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 167 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 168 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 169 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 170 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 171 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 172 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 173 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 174 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 175 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 176 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 177 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 178 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 179 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 180 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 181 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 182 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 183 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 184 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 185 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 186 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 187 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 188 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 189 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 190 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 191 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 192 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 193 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 194 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 195 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 196 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 197 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 198 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 199 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T 200 T G C A C G T G C A C G T G C A C G T </pre>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

5 SOUS-UNITE D'UNE CAPSULE PROTEIQUE CS31A
MODIFIEE PAR AU MOINS UN PEPTIDE HETEROLOGUE, CAPSULE
PROTEIQUE CS31A COMPORTANT UNE TELLE SOUS-UNITE ET
MICRO-ORGANISMES DONT LA MEMBRANE EXTERNE PORTE DE
TELLES SOUS-UNITES; PROCEDES D'OBTENTION ET UTILISATION
DE CEUX-CI.

10 La présente invention concerne la sous-unité
de la capsule protéique CS31A, dénommée protéine ClpG,
dont la séquence en acides aminés est modifiée par au
moins un peptide hétérologue.

15 L'invention concerne aussi la capsule
protéique CS31A comportant une telle sous-unité, ainsi
que les micro-organismes qui portent une capsule
protéique CS31A dont la séquence en acides aminés de la
sous-unité est modifiée par au moins un peptide
hétérologue.

20 L'invention concerne encore les procédés
d'obtention de telles sous-unités, des capsules
protéiques CS31A les comportant et des micro-organismes
portant ces capsules protéiques CS31A, ainsi que
l'utilisation de ceux-ci pour la préparation de vaccins,
la production de peptides et la préparation de tests
immunologiques.

25 La membrane externe des micro-organismes
comporte des structures protéiques diverses telles que
des flagelles, pili, fimbriae ou des capsules
protéiques, conférant notamment auxdits micro-organismes
des propriétés de mouvement ou d'attachement.

30 Ces structures comportent des molécules
hautement antigéniques ayant permis de préparer à partir
de la structure protéique isolée de ces micro-organismes
ou à partir des micro-organismes eux-mêmes, des vaccins
correspondants aux divers types d'antigènes isolés dans
35 ces micro-organismes. Ainsi la demande de brevet

français publiée sous le numéro 2 466 251 propose un vaccin anticolibacillaire animal contenant au moins un antigène provenant de différentes souches d'Escherichia Coli.

5 En outre, ces molécules constituent autant de protéines porteuses dans lesquelles peuvent être introduits des épitopes étrangers conférant aux dites protéines un caractère antigénique nouveau dont l'immunogénicité permet l'utilisation comme vaccin.
10 Ainsi la demande de brevet européen publiée sous le numéro 264 150 décrit des micro-organismes dont la membrane externe porte des pili dont la composition a été modifiée par un changement de la séquence protéique de la sous-unité.

15 Les structures membranaires comme les pili, les fimbriae ou les capsules protéiques apparaissent plus avantageuses dans le domaine de la vaccination que les protéines de membrane externe. En effet dans le cas des pili l'ensemble de la protéine structurale est à
20 l'extérieur de la cellule, alors que pour les protéines de membrane externe, certaines régions polypeptidiques seulement sont présentées à la surface cellulaire et l'accessibilité à ces protéines risque d'être entravée par le lipopolysaccharide et les enveloppes capsulaires.
25 De plus, les sous-unités des fimbriae ou des capsules protéiques sont présentées à la surface bactérienne en nombre beaucoup plus élevé que les protéines de membrane externe.

30 En outre, la purification d'une protéine de membrane est plus difficile que celle de protéines qui sont totalement extérieures aux micro-organismes comme les pili ou fimbriae.

35 La nature des micro-organismes concernés par l'invention dépend uniquement de leur capacité à produire la capsule protéique CS31A; il s'agit plus

particulièrement de bactéries de la famille des enterobacteriaceae appartenant aux espèces Escherichia coli et Klebsiella pneumoniae.

De nombreux travaux ont été effectués sur les pili de E.coli, et plus particulièrement les sous-unités fimbriales K88 et K99 ont été largement décrites.

Des travaux plus récents ont mis en évidence chez une souche sauvage de E.coli dénommée 31A+ dans la demande de brevet français publiée sous le numéro 2 466 251, une structure protéique dénommée CS31A. L'opéron gouvernant la biogénèse de cette structure a été cloné dans un organisme hôte, et le gène codant pour la sous-unité de CS31A, dénommée Clpg, a été localisé, caractérisé et séquencé. (C. Martin, C. Boeuf, F. Bousquet; Microbial Pathogenesis 1991; 10: 429-442) ; (J. P. Girardeau, Y. Bertin, C. Martin, M. DerVartanian, C. Boeuf; Journal of Bacteriology; Dec. 1991, vol. 173, No. 23, p. 7673-7683) ; (M. J. Korth, R. A. Schneider, S. L. Moseley; Infection and Immunity; July 1991, vol. 59, No. 7, p. 2333-2340).

La structure CS31A est une capsule protéique moins organisée et plus souple que les flagelles et fimbriae lesquels sont davantage organisés et rigides; en conséquence, il apparait que la taille des peptides susceptibles d'être exprimés dans les fimbriae et flagelles pourra difficilement dépasser une quinzaine d'acides aminés, alors que l'utilisation des capsules protéiques CS31A permet d'obtenir l'introduction de séquences étrangères de taille plus importante, comptant jusqu'à une centaine d'acides aminés.

Cependant l'introduction de séquences peptidiques hétérologues n'est possible au niveau de la protéine que dans certains sites permissifs dont il faut déterminer la taille et la position.

La présente invention a précisément pour objet la définition des régions de la protéine ClpG dans lesquelles des peptides hétérologues peuvent être introduits sans perturber la biogénèse de la capsule protéique CS31A.

Les techniques utilisées pour le clonage et le séquençage du gène codant pour la sous-unité de CS31A, ainsi que pour l'identification des régions de ladite sous-unité acceptant des insertions et/ou substitutions hétérologues seront décrites dans la description détaillée de l'invention. Il sera plus particulièrement fait référence dans ce qui suit à la figure 9 représentant la séquence nucléotidique du gène codant pour la sous-unité de CS31A et la séquence polypeptidique déduite de cette séquence nucléotidique.

L'identification des régions potentiellement permissives a tout d'abord consisté à définir des régions variables dans une famille de protéines apparentées à CS31A, à savoir K88 et F41, puis les épitopes continus, d'une part des sous-unités dénaturées et d'autre part de la protéine native, puis à définir l'accessibilité desdits épitopes continus.

Les épitopes continus correspondent souvent aux régions variables de ces protéines. De plus, s'agissant des régions immunodominantes de la protéine, ces zones paraissent particulièrement indiquées pour présenter au système immunitaire des épitopes vaccinaux introduits dans des protéines recombinantes.

L'étude immunostructurale a permis de localiser clairement les épitopes continus dans des régions variables, lesquelles sont généralement flexibles, hydrophiles et accessibles aux anticorps dans la protéine native. Ainsi à condition qu'elles soient permissives, les régions variables immunoréactives délimitées par les acides aminés situés dans la figure 9

aux positions suivantes : 10-19, 38-58, 88-106, 144-172, 184-220 et 223-245, seront choisies pour des modifications par des peptides hétérologues.

Outre la comparaison des séquences de CS31A, K88 et F41, et l'étude immunostructurale de CS31A, une technique de mutagenèse insertionnelle au hasard a complété l'étude des zones de la protéine CS31A susceptibles d'accepter des additions ou substitutions de peptides hétérologues.

La mise en oeuvre de ces techniques a permis d'identifier de façon présomptive quatre régions aptes à accepter des modifications par des peptides hétérologues sans affecter la biogénèse de CS31A :

- Région A recouvrant le peptide signal et l'extrémité N-terminale de la protéine mature délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions -13 et +8.

- Région B, délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 10 et 58.

- Région C, délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 123 et 164.

- Région D, délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 183 et 257.

En conséquence, l'invention concerne une sous-unité d'une capsule protéique CS31A dont la séquence en acides aminés est modifiée au niveau d'au moins une des régions A, B, C et D définies ci-dessus, par au moins un peptide hétérologue.

La région A accepte l'introduction de 4 à 20 acides aminés hétérologues par mutagenèse insertionnelle au hasard. L'invention concerne plus particulièrement une sous-unité de la capsule CS31A dont la séquence en acides aminés est modifiée par au moins un peptide hétérologue, entre les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions -1 et +1.

La région B contient une séquence variable, dénommée V1, délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 10 et 58. Des insertions de 4 à 18 acides aminés ont été obtenues par mutagenèse insertionnelle au hasard dans la région B. De plus, la région B comporte deux peptides particulièrement immunogènes et antigéniques dans la forme dénaturée de la protéine, ceux-ci sont délimités respectivement par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 10 et 19 et 38 et 58. L'invention concerne donc plus particulièrement une sous-unité de la capsule CS31A dont la séquence en acides aminés est modifiée par l'introduction d'au moins un peptide hétérologue, au niveau de l'un au moins de ces deux peptides.

La région C contient une séquence variable, dénommée V2, délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 123 et 150. Des insertions de 4 à 18 acides aminés hétérologues ont été obtenues par mutagenèse insertionnelle au hasard dans la région C. De plus, la région C contient dans sa partie C-terminale, un épitope continu délimité par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 151 et 160. L'invention concerne donc plus particulièrement une sous-unité de la capsule CS31A dont la séquence en acides aminés est modifiée par l'introduction d'au moins un peptide hétérologue, au niveau de cet épitope.

La région D contient une région variable, dénommée V3, délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 183 et 221. Cette région contient le seul épitope continu antigénique et immunogène dans la protéine native, celui-ci est délimité par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 188 et 196. De plus, la partie C-terminale de la région D comporte trois autres peptides immunogènes et antigéniques dans la forme dénaturée de

la protéine, ceux-ci sont délimités respectivement par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 211 et 219, 223 et 231 et 235 et 246. L'invention concerne donc plus particulièrement une sous-unité de la capsule CS31A dont la séquence en acides aminés est modifiée par l'introduction d'au moins un peptide hétérologue au niveau de l'un au moins de ces quatre peptides.

Différents épitopes, notamment vaccinnants, provenant de bactéries, de parasites ou de virus peuvent être introduits dans la protéine ClpG.

Ainsi l'invention concerne la sous-unité d'une capsule protéique CS31A dont la séquence en acides aminés est modifiée par au moins un peptide hétérologue choisi parmi : l'épitope C ou l'épitope A du virus de la gastroentérite transmissible du porc, un épitope de la protéine VP6 du rotavirus bovin, l'épitope C3 du virus polio, un épitope de la protéine VP1 du virus de la fièvre aftreuse.

A titre d'exemple, on peut citer l'introduction de l'épitope C ou de l'épitope A du virus de la gastroentérite transmissible (GET) du porc dans l'une au moins des régions permissives de la protéine ClpG constituant la sous-unité de CS31A. La sous-unité ou la capsule protéique ou encore le micro-organisme, ainsi modifiés présente l'épitope C et/ou l'épitope A, et sont particulièrement utiles pour la préparation d'un vaccin contre le virus de la gastroentérite transmissible chez le porc.

On peut encore citer à titre d'exemple, l'introduction d'un épitope de la protéine VP6 du rotavirus bovin dans l'une au moins des régions permissives de la protéine ClpG constituant la sous-unité de CS31A, et l'utilisation soit de la sous-unité, soit de la capsule protéique, soit d'un micro-organisme

modifié génétiquement afin d'exprimer au niveau de la capsule protéique CS31A l'épitope de la protéine VP6 du rotavirus bovin, pour la préparation d'un vaccin contre la diarrhée à rotavirus chez le veau.

5 Les modifications de la séquence protéique de la sous-unité sont avantageusement réalisées par des techniques de génie génétique, consistant à modifier la séquence d'ADN sauvage codant pour la sous-unité, afin d'obtenir une séquence en acides aminés modifiée.

10 Outre les modifications consistant en la substitution et/ou la suppression et/ou l'addition de une ou plusieurs bases au niveau de la séquence d'ADN codante, et n'entraînant aucune conséquence sur la biogénèse de la sous-unité, on entend tout
15 particulièrement par modification, l'introduction dans l'ADN sauvage d'un fragment d'ADN étranger dont la séquence et sa phase de lecture dans le gène recombinant déterminent la séquence polypeptidique hétérologue introduite dans la séquence en acides aminés de la sous-
20 unité. Il peut alors s'agir du remplacement d'un fragment de l'ADN sauvage par un fragment d'ADN étranger ou de l'addition d'un fragment d'ADN étranger.

L'invention concerne donc aussi les procédés permettant d'obtenir une sous-unité d'une capsule CS31A
25 dont la séquence en acides aminés est modifiée par au moins un peptide hétérologue, consistant à introduire au niveau d'au moins une des régions permissives A, B, C, D du gène sauvage codant pour la sous-unité, au moins un fragment d'ADN codant pour un peptide hétérologue. Les
30 séquences hétérologues sont introduites :

- par clonage après mutagenèse dirigée conduisant à la création de sites de restriction permettant des insertions ou des substitutions;

- par clonage dans des sites de restriction tels que EcoR1, introduits par mutagénèse insertionnelle au hasard;

- par insertion dirigée en clonant directement la séquence hétérologue entre le peptide signal et le peptide mature de la pré-protéine ClpG.

Le fragment d'ADN étranger peut être naturel ou synthétique; il est choisi ou préparé en fonction du peptide que l'on souhaite exprimer au niveau de la sous-unité de CS31A, lui même déterminé selon l'application envisagée.

L'invention concerne aussi les capsules protéiques CS31A comportant une sous-unité ClpG modifiée selon l'invention, ainsi que les micro-organismes dont la membrane externe porte de telles capsules. Celles-ci peuvent être obtenues par exemple en cultivant une bactérie E. coli exprimant les gènes gouvernant la biogénèse de la capsule CS31A modifiée par au moins un fragment d'ADN codant pour un peptide hétérologue. De manière avantageuse, la culture précédente est réalisée soit sur un milieu de culture gélosé permettant la collecte des bactéries à la surface de la gélose, soit sur un milieu liquide en fermenteur permettant la collecte des bactéries après centrifugation. Une fraction enrichie en capsule CS31A modifiée peut être obtenue à partir de ces micro-organismes par une agitation vigoureuse des suspensions bactériennes issues de la collecte à la surface de la gélose ou culture en fermenteur. Après centrifugation à 5000 g, on obtient un surnageant riche en capsule CS31A modifiée. Celle-ci peut être avantageusement purifiée à partir d'une fraction précipitée au sulfate d'ammonium 20 % par une étape de chromatographie à interaction hydrophobe sur phényl Sépharose. L'élution par l'eau permet d'obtenir un produit de haut poids moléculaire dont le degré de

pureté est supérieur à 90 %. A partir de cette fraction, les sous-unités CS31A modifiées peuvent être facilement purifiées par filtration moléculaire sur une colonne de Sephacryl S 300 en présence de chlorure de guanidium 6 M.

La sous-unité de CS31A présente un caractère fortement antigénique et immunogénique. L'introduction d'un peptide hétérologue au sein de cette sous-unité, dans les régions définies précédemment, permet de conférer un caractère antigénique nouveau tant à la sous-unité qu'aux micro-organismes dont les capsules CS31A portent une telle sous-unité.

La capsule protéique CS31A constitue en outre un système particulièrement adapté à la production de peptides destinés notamment à la préparation de tests immunologiques; les protéines hybrides obtenues par introduction dans le gène codant pour la protéine ClpG d'un ADN codant pour un peptide hétérologue préalablement déterminé, peuvent être avantageusement utilisées, soit en tant qu'antigène pour la détection d'anticorps, soit en tant qu'immunogène pour produire des anticorps contre des protéines par exemple de pathogènes qu'il est impossible de cultiver.

Ainsi l'invention concerne l'utilisation de la sous-unité de CS31A dont la séquence en acides aminés est modifiée par au moins un peptide hétérologue, la capsule protéique CS31A comportant une telle sous-unité, ou encore les micro-organismes dont la membrane externe porte de telles capsules protéiques CS31A, en tant que principe actif pour la fabrication de compositions immunogènes.

Ces compositions immunogènes peuvent avantageusement être mises en oeuvre pour la préparation de vaccins humains ou animaux ou encore de tests immunologiques, utiles en santé humaine ou animale.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront dans la description qui suit, se rapportant au clonage et au séquençage du gène codant pour la sous-unité de CS31A, ainsi qu'à l'identification des régions de la sous-unité ClpG pouvant accepter des peptides hétérologues et à l'introduction de tels peptides dans les régions déterminées, et enfin à l'immunogénicité des peptides hétérologues dans les protéines ClpG recombinantes produites par les bactéries.

A) MATERIEL ET METHODES.

1) Souches E. coli et plasmides.

- DB 6433 : Δ (lacZYA), pro, met, Su III, λ S, Nal^r, Rif^r. (Davis RW, Botstein D, Roth JR. In : Advanced bacterial genetics. New York : Cold Spring Harbor laboratory 1980).

- 31A : souche sauvage hébergeant p31A, déposée à la collection de l'Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, Paris 15, sous le N° I105.

- Orne 6 : souche sauvage de sérotype 017: K7: H18 produisant CS31A, utilisée pour purifier CS31A. Cette souche E. coli ne porte pas d'autres protéines de surface susceptibles d'interférer ou compliquer la purification de CS31A.

Les souches bactériennes utilisées pour le transfert de plasmides recombinants par transformation sont :

- DH5 α : F- Φ 80 dlac Z Δ M15, end A1, rec A1, hsdR17 (r⁻k, m⁺k) sup E44, thi-1, gyr A, rel A1, Δ (lac ZYA -arg F), U169, λ^- . (Bethesda Research Laboratories, Life Technologies, Inc.).

- JM 109 : F'traD36, lac Iq, Δ (lacZ) Δ M15, proAB, recA1, end A1, gyr A96, thi, hsd R17, supE 44e14⁻

, rel A1, Δ (lac-proAB). (Yanisk-Perron C, Viera J, Messing J, (1985). Gene 33, 103-119).

Les plasmides pDSPH524, pPSX83 et pDEV41155 utilisés et construits durant ce travail sont décrits au chapitre E ci-après relatif à la complémentation intergénique.

Les cultures sont réalisées en milieu Luria-Bertani (LB) liquide ou solide additionné des antibiotiques appropriés aux concentrations de 100 $\mu\text{g/ml}$ ou 50 $\mu\text{g/ml}$ pour l'ampicilline, 25 $\mu\text{g/ml}$ pour le chloramphénicol et 10 $\mu\text{g/ml}$ pour la tétracycline.

La production de bêta-galactosidase est mise en évidence par la coloration bleue des colonies sur un milieu LB contenant 2 mM d'isopropyl-bêta-D-thiogalactoside (IPTG) et 40 $\mu\text{g/ml}$ de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-galactopyranoside (X-gal).

Les enzymes de restriction sont utilisées selon les recommandations des fabricants.

Les conditions de digestion par la Dnase I sont de 1 ng/ μg d'ADN circulaire pendant 15-20 mn à 25°C dans le tampon Dnase (200 mM Tris-HCl; pH 7,5; 15 mM MnCl₂; 1 mg BSA/ml).

La T4-DNA polymérase est utilisée à 3,3 U/ μg d'ADN à 22°C pendant 30 mn et le fragment Klenow de l'ADN polymérase de E.coli à 2,5 U/ μg d'ADN à 22°C pendant 30 mn en présence de 1mM de dNTP. Le tampon polymérase est : 200 mM Tris-HCl; pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT.

La T4-DNA ligase est employée à 0,2 U/ μg d'ADN à 10°C pendant la nuit pour la ligation des bouts cohésifs, à 1 U/ μg d'ADN à 4°C pendant la nuit pour la ligation d'extrémités franches et à 10 U/ μg d'ADN à 4°C pendant la nuit pour la ligation des linkers non phosphorylés. Le tampon utilisé pour la ligation de ces linkers est : 660 mM Tris-HCl; pH 7,5; 50 mM MgCl₂;

50 mM DTT; 1 mg/ml BSA; 10 mM Hexamine Cobalt (III) chloride; 2 mM ATP; 5 mM spermidine.

2) Préparation des linkers (annealing).

5 Afin d'effectuer la ligation, les linkers doivent être préhybridés. La concentration des linkers EcoRI non phosphorylés est de 1 µg/µl dans du TE (10mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA). La solution contenant les oligonucléotides est incubée 1 mn à 80°C, puis
10 transférée dans un bécher de 500 ml contenant de l'eau à 65°C. Le bécher est placé dans la glace. Lorsque la température atteint 4°C les linkers préhybridés peuvent alors être congelés à -20°C avant leur utilisation.

15 3) Préparation d'ADN.

Les plasmides sont extraits soit par la méthode du lysat alcalin soit par la méthode du "boiling" pour les minipréparations des ADN (Maniatis et al. 1982. Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold
20 Spring Harbor Laboratory). La préparation de plasmides à l'aide de kits d'extraction Quiagen a aussi été utilisée pour la purification de l'ADN.

4) Transformation.

25 La technique au CaCl₂ est employée pour la transformation de E.coli DH5 α et de E.coli JM109 (Maniatis et al. 1982). Un à 10 µl du mélange de ligation sont utilisés pour transformer la souche. Les transformants sont sélectionnés sur LB agar contenant
30 les antibiotiques appropriés.

5) Electrophorèses.

Pour l'analyse de l'ADN, les électrophorèses en gels d'agarose sont réalisées sur des appareils
35 horizontaux en tampon Tris-Borate (Tris 90 mM; acide

borique 90 mM; EDTA 2 mM; pH. 8,0) en présence de bromure d'éthidium. Le standard de taille est, soit l'ADN ladder 1 Kb (Gibco-BRL), soit l'ADN ladder VIII (Boehringer), soit l'ADN ladder 100pb (Pharmacia).

5 Pour l'analyse des protéines, les gels SDS-PAGE sont réalisés sur des appareils verticaux à la concentration de 10 à 15% de polyacrylamide selon la technique classique décrite par Laemmli (1970. Nature; 227, 680-685).

10

6) Séquençage.

Le séquençage est réalisé sur l'ADN double ou simple brin par la méthode de Sanger et al. (1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 5463-5467) avec la s15 séquenase -T7 polymérase modifiée, le dATP (α -³⁵ S) et un kit de séquençage (U.S. Biochemical Corp. ou multiwell Amersham).

7) Constructions génétiques.

20 Les techniques classiques de génie génétique utilisées pour les diverses constructions génétiques sont décrites par Maniatis et al. (1982) ou Sambrook et al. (1989).

25

8) Mutagenèse dirigée.

La méthode employée est celle de l'ADN partiellement simple brin (gap-duplex-DNA). Elle utilise les vecteurs pMa5-8 et pMc5-8 et est décrite par Stanssens et al. (NAR, 1989, 17, 4441-4454).

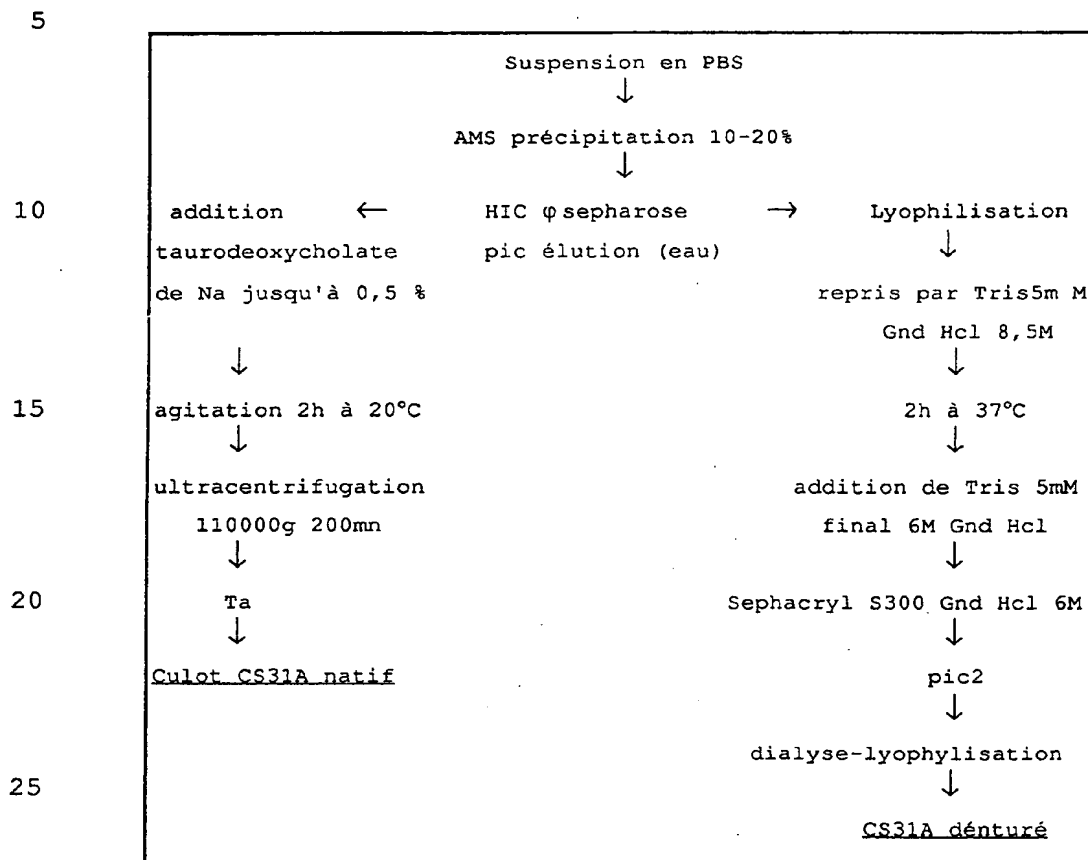
30

9) Préparation de la protéine CS31A.

La protéine CS31A est purifiée selon deux méthodes, l'une permet d'obtenir une forme purifiée native, l'autre une forme purifiée dénaturée.

Le tableau 1 ci-après indique les schémas de purification de la protéine CS31A sous ses formes native ou dénaturée.

Tableau 1



a) Purification sous forme native (polymérique).

La purification de l'antigène natif de haut poids moléculaire est réalisée selon une méthode simple décrite ci-après dont les différentes étapes permettent d'éliminer la quasi totalité des contaminations, en particulier celles liées aux débris membranaires

(protéines et LPS). Le tableaux 1 ci-dessus et le tableau 2 ci-après permettent de suivre les étapes de la purification (dosage du KDO : Méthods in microbiology, vol.5B, p. 209-344). Les bactéries récoltées en PBS à partir d'une culture de 10 flacons de Roux en milieu gélosé Minca décrit par Guinée (Infection and Immunity, 1976, 13, 1369-1377) sont homogénéisées à vitesse maximum pendant 3 x 1 mn à température ambiante puis centrifugées 15 mn à 25000 g. Le surnageant est centrifugé à 10°C pendant 30 mn à 55000g. Le surnageant obtenu est soumis à une précipitation séquentielle au sulfate d'ammonium. Le culot obtenu entre 10 et 20 % de saturation est remis en solution dans du PBS pH 7,2 à 4°C pendant une nuit, additionné de NaCl (2 M), laissé en équilibre une heure à température ambiante, puis purifié par chromathographie à interactions hydrophobes (HIC) sur phenyl Sepharose CL4B (Pharmacia). La protéine native éluée par l'eau est additionnée de taurodeoxycholate de sodium (DOC) 0,5% puis soumis à une ultra centrifugation de 200 mn à 110.000 g. Le culot (UC en TDC) essentiellement constitué par la protéine CS31A sous forme native de haut poids moléculaire est repris en tampon Tris 10 mM (pH 7,8) et laissé en dissolution à 4°C (une nuit sans agitation).

Le tableau 2 ci-après indique les mesures de contrôle de la purification de CS31A par mesure du KDO résiduel.

Tableau 2

	CS31A natif			
	Orne 6 (UC en TDC)			
	Protéines			
	mg totales	% des protéine totales	% pds sec bactéries	KDO total µg
Surnageant 12000 g	54,60	100	4,23	0,110
Surnageant 50000 g	52,00	95	4,03	0,110
Surnageant 20%	29,45	54	2,22	0,065
Culot 20%	5,40	9,9	0,42	0,009
HIC élué 2M NaCl	0,35	0,7	0,03	0
HIC élué eau	1,806	3,3	0,14	0
UC en TDC 110000 g 200 nm	1,033	1,9	0,08	0

5 b) Purification de CS31A sous forme dénaturée (sous-unité).

10 L'antigène de haut PM purifié (lyophilisat. HIC) comme décrit dans le tableau 1, est dissocié en sous-unités (30 kDa) par 8,5 M de chlorure de guanidium (Gnd, Hcl) 2h à 37 °C. La concentration est ramenée à 6 M de (Gnd, Hcl) par addition de Tris (pH 7,8) et la protéine est purifiée par une chromatographie sur gel permeation sur Sephacryl S 300 (Pharmacia) en tampon dissociant (Tris pH 7,8; Gnd, Hcl 6 M). Le produit correspondant à l'élution d'une protéine de 30 KDalton

d'ammonium (5 mM pH 7,8), lyophilisé et conservé à -80°C.

10) Préparation des anticorps spécifiques.

5 Les anticorps ont été préparés chez le lapin (soit contre la protéine native soit contre la protéine dénaturée) par 4 injections intra-dermiques de 250 µg de protéines purifiées, à 15 jours d'intervalle en présence d'adjuvant de Freund incomplet. Les IgG ont été
10 purifiées par chromatographie d'affinité sur Protéine A Sépharose (Pharmacia) et marquées à la biotine par la méthode décrite par Hantowich et al. (Journal Nuclear Medicine 1987; 28; 1294-1302).

15 Les antipeptides ont été obtenus par trois injections intra-dermiques de peptides synthétiques couplés à l'ovalbumine par la glutaraldéhyde ou par la Bis-aminobenzidine sur résidu tyrosine (présence d'un NH₂ dans le peptide) suivant les techniques décrites par
20 Van Regenmortel et al. (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Synthetic polypeptides as antigens, 1988).

Afin d'éviter les réactions non spécifiques, les anticorps utilisés sont absorbés contre les différentes souches bactériennes, soit avec des cellules
25 entières, soit avec des extraits cétoniques obtenus à partir de préparations cellulaires ultra soniquées.

11) Techniques immunologiques.

- La présence de l'antigène CS31A sur des
30 bactéries absorbées sur un filtre de nitrocellulose est révélée par une méthode immunologique en utilisant des anticorps spécifiques polyclonaux dirigés soit contre la protéine préparée sous forme native ou dénaturée, soit contre des peptides couplés à l'ovalbumine. La fixation
35 des anticorps non marqués est détectée par des IgG de

chèvre anti-lapin marquées à la peroxydase (Nordic), celle des IgG biotinylées par la streptavidine couplée à la peroxydase (Pierce) le substrat étant le 4-chloronaphtol. Les protéines séparées par SDS-PAGE sont transférées sur membrane de nitrocellulose, laquelle est ensuite soumise à un test de détection immunologique avec les divers anticorps spécifiques décrits ci-dessus selon la technique dite du "Western blot".

5 - Le dosage des antigènes et des anticorps est réalisé par une méthode ELISA par capture d'anticorps (directe ou "sandwich") pour le dosage des anticorps, et en compétition pour le dosage de l'antigène. La spécificité et le titre des anti-peptides sont mesurés par une méthode de capture d'anticorps par les peptides fixés sur des plaques Immulon II (Dynatech).

10 - La définition des épitopes continus est réalisée par mesure de l'immunoréactivité de 257 peptides de 9 résidus se chevauchant à un résidu prêt, recouvrant la totalité de la séquence primaire de la protéine.

15 L'épitope scanning décrit par Geysen et al. (1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3998) est réalisé grâce à un kit (Cambridge Research Biochemicals Northwich, UK) fournissant : un logiciel qui permet de piloter la synthèse peptidique et d'exploiter les résultats; les têtes de synthèse activées; les 20 dérivés des acides aminés nécessaires à la synthèse des peptides. La détection des anticorps fixés sur les peptides est assurée par une méthode ELISA, la lecture des plaques (Dynatec MR5000) et la définition des épitopes sont pilotées par le logiciel livré par le fournisseur. Les épitopes ont été définis avec les anticorps dirigés contre la protéine native ou contre la protéine dénaturée.

20

25

30

35

L'antigénicité des épitopes ainsi définis a été mesurée soit :

- en comparant le profil d'épitope scanning obtenu avant et après compétition avec l'antigène sous forme native;
- en mesurant la diminution du titre d'antipeptides soumis à une compétition avec la protéine native;
- en mesurant la capture des anticorps par la protéine native (ELISA sandwich ou Dot-Blot sur nitrocellulose).

12) Observation en microscopie électronique.

Toutes les observations ont été réalisées avec un microscope électronique EM400 (Philips Electronic Instrument, Inc., Mahwah, N.J.) avec un courant d'accélération de 80 Kv.

Les bactéries et les extraits purifiés ont été observés (grille 300 mesh recouverts de collodion) après coloration négative par 1 % d'acide phosphotungstique.

Les cellules bactériennes entières ont été observées après marquage à l'or colloïdal après avoir fait agir les anticorps anti-CS31A obtenus contre la protéine native, par la technique décrite par Levine et al. (Infection and Immunity : 1984, 44, 409-420). Le marquage à la ferritine sur coupe de bactérie a été réalisé par la méthode décrite par Orskov et al. (Infection and Immunity : 1985, 47 : 191-200). Les anticorps primaires ont été dilués au 1/8, le sérum de chèvre anti IgG de lapin marqué à l'or colloïdal (Jansen Pharmaceutical, Piscataway, N.J.) et le sérum de chèvre anti IgG lapin marqué à la ferritine (Miles-Yeda, L td. Rehovot, Israël) ont été utilisés au 1/50.

B) ETUDE MORPHOLOGIQUE DE L'ANTIGENE CS31A
EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

5 I - Observations après coloration négative
(acide phosphotungstique).

1) Sur cellules entières.

10 La Figure 1 est une photographie représentant une coloration négative x110000 de la souche sauvage de référence E.coli 31A. Cette bactérie exprime à sa surface des flagelles (fl), des fimbriae rigides dénommés 20K (fim) et l'antigène CS31A (clp).

15 Les fimbriae 20K ont une structure filamenteuse rigide de 5 nm de diamètre et peuvent atteindre une longueur de 1 µm. L'antigène CS31A ne présente pas cet aspect filamenteux, mais forme une structure capsulaire granuleuse qui enveloppe entièrement la surface de la cellule bactérienne.

20 2) Sur des extraits totaux.

Les structures péricellulaires ont été séparées des cellules bactériennes par Vortex.

25 Après coloration négative (x110 000), on observe clairement sur la photographie de la figure 2 les flagelles (fl) et fimbriae 20K (fim). L'antigène CS31A (clp) a l'aspect d'une masse granuleuse qui adhère aux autres structures. Chaque granule a une dimension estimée de 50 x 100 Å. Ces grains pourraient représenter la sous-unité constitutive de l'antigène CS31A.

30 3) Sur des extraits purifiés.

La photographie de la figure 3 montre l'antigène CS31A purifié de haut poids moléculaire, après coloration négative.

La fraction purifiée a un aspect granuleux déjà observé sur les autres préparations. On ne distingue aucune structure fibrillaire, les "grains" semblent désordonnés. Par comparaison, l'extrait purifié d'antigène K88 montre clairement un aspect fibrillaire (photographie de la Figure 4).

II - Observation après marquage par des anticorps spécifiques.

1) Révélation à l'or colloïdal (10 nm) sur cellules entières.

Après dépôt sur les grilles, l'antigène CS31A a été marqué par un anticorps spécifique (lapin), puis révélé par un anti-lapin conjugué à l'or colloïdal.

Sur la photographie de la figure 5, on observe que les grains d'or sont répartis uniformément autour de la cellule bactérienne, qu'il n'y a pas de marquage de fibres comme on l'observe généralement avec des fimbriae. L'antigène CS31A semble se détacher facilement de la cellule.

2) Révélation à la ferritine sur coupe de 50 nm d'épaisseur.

Les bactéries sont marquées par des anticorps spécifiques anti CS31A obtenus en immunisant des lapins et par des anti-IgG de lapin obtenues sur chèvre conjugués à la ferritine. Les cellules sont ensuite enrobées dans une résine synthétique puis coupées.

La photographie de la figure 6 montre que les grains de ferritine sont disposés tout autour d'une structure de type capsulaire qui enveloppe entièrement la cellule bactérienne. Aucune structure fibrillaire n'est marquée par la ferritine.

III - Conclusions de l'étude structurale de CS31A.

Dans un fimbria, les sous-unités (piline) polymérisées, adoptent une structure hélicoïdale plus ou moins "tendue". Dans les fimbriae dits "rigides" (diamètre de 5-7 nm) les sous-unités sont enroulées le long d'un squelette hélicoïdal, les sous-unités d'une spire formant des interactions avec les sous-unités des autres spires. Dans les "fimbrillae" ou fimbriae flexibles (diamètre de 2 nm) les sous-unités sont également enroulées sur un squelette hélicoïdal, mais les sous-unités d'une spire n'ont plus d'interactions directes avec les sous-unités des autres spires. Par contre, les hélices "détendues" peuvent former des fuseaux en associant des centaines de fibres individuelles. Les antigènes K88 et F41 adoptent ce type de structure comme le montre la photographie de la figure 4.

Dans le cas de CS31A, les sous-unités protéiques sont polymérisées, mais ne semblent pas enroulées sur un squelette hélicoïdal et ne forment pas de fimbrillae. Les sous-unités s'associent en masse granuleuse pouvant ressembler à une capsule. Ce type d'organisation de type "capsule like antigen" a été décrit en 1985 par Orskov et al. (An adhesive capsule of Escherichia coli. Infect. Immun. 1985, 47 : 191-200).

Les résultats déjà publiés (Infect. Immun. 56 : 2180-2188) montrent ce type de structure capsulaire. Cependant la terminologie de "capsule like" n'ayant pas été adoptée, le terme de fimbriae qui paraissait convenir a été retenu, mais les travaux menés ultérieurement à partir d'extraits purifiés, confirment pourtant l'aspect non fibrillaire de l'antigène CS31A, comme le montre la photographie de la figure 3.

C) CLONAGE DES GENES NECESSAIRES A LA BIOGENESE DE CS31A.

5 Les gènes nécessaires à la biogénèse de CS31A sont portés sur un plasmide conjugatif, p31A, hébergé par la souche sauvage de référence E.coli 31A.

Ce plasmide de 180 kb, transféré dans la souche E.Coli K12 DB 6433 a été purifié puis restreint de façon partielle par l'endonucléase Sau3AI.

10 Les fragments de restriction de 9,5 à 11,5 kb sont clonés dans le vecteur pSUP202 (Simon R. et al., 1983) restreint par BamHI et traité à la phosphatase alcaline. Deux cent quatre vingt cinq recombinants résistants au chloramphénicol et sensibles à la tétracycline (Cm^r, Tc^s) ont été testés pour la présence de CS31A grâce à un anticorps polyclonal anti-CS31A. Quatorze donnent une réaction positive. Ils hébergent un plasmide contenant un fragment de restriction de 9 à 11 kb selon le cas, dans l'une ou
20 l'autre orientation.

L'expression des gènes clonés ne semble donc pas dépendre d'un promoteur extérieur. Un fragment HindIII-EcoRI de 8,5 kb, commun à tous les clones est cloné d'une part dans le plasmide vecteur pBR322 coupé par HindIII + EcoRI, conduisant à l'obtention du plasmide pAG315 (Martin C. et al., 1991), et d'autre
25 part dans le plasmide vecteur à faible nombre de copie pMSG575, conduisant à l'obtention du plasmide pEH524 (Martin C. et al., 1991).

30 La figure 7 représente l'analyse en Western blot d'extraits de bactéries hébergeant les différents plasmides recombinants, et d'un antisérum polyclonal anti-CS31A. Les extraits sont constitués par le surnageant d'une suspension bactérienne chauffée
35 20 minutes à 60°C.

Les sous-unités de CS31A produites par une souche K12 de E.coli hébergeant pAG315 ou pEH524 ont la même masse moléculaire apparente que celles produites par la souche 31A et sont reconnues par les anticorps anti-CS31A.

La figure 8 représente une carte de restriction sommaire de pEH524, ainsi que la carte génétique des déterminants CS31A. Celle-ci a été réalisée à partir de résultats obtenus par mutagenèse insertionnelle de phages Mini-Mu dans pAG315 et étude des protéines synthétisées par les plasmides mutants dans des minicellules, ainsi que par la détermination de la séquence nucléotidique de certains gènes (clpE, clpF, clpG, clpH, clpI). Le gène de structure clpG est indiqué par une étoile. Les lettres représentent les enzymes de restriction suivantes : B = BstXI; C = ClaI; E = EcoRI; H = HindIII; Hp = HpaI; K = KpnI; N = Nru I; P = PvuII; S = Sma I; Sc = SacI; Sp = SphI.

D) SEQUENCAGE.

Le gène codant pour la sous-unité CS31A a été séquencé sur les deux brins par la méthode de Sanger.

La figure 9 représente la séquence complète du gène clpG. On observe la présence d'une seule phase de lecture ouverte de 834 paires de bases débutant au codon d'initiation ATG localisé 60 pb en amont du premier site SphI et se terminant par trois codons stop localisés aux positions 1218, 1227 et 1245. Cette phase de lecture code pour une protéine de 278 résidus correspondant à un poids moléculaire de 28780 daltons. La sous unité CS31A est synthétisée sous forme d'un précurseur portant une séquence signal de 21 acides aminés clivée devant le résidu tryptophane au moment de

l'exportation dans le périplasme. La sous-unité mature est donc constituée de 257 résidus donnant un polypeptide de poids moléculaire déduit de 26777 daltons.

5 Une séquence AAGGAA située à 10 paires de bases en amont de l'ATG pourrait constituer une séquence de fixation du ribosome (RBS). La localisation de l'extrémité 5' de l'ARN messager révèle l'existence de deux sites de départ de transcription séparés par 76 pb et suggère que le gène est transcrit à partir d'un tandem de promoteurs indiqués P1 et P2 sur la figure 9.

E) COMPLEMENTATION INTERGENIQUE.

15 La complémentation intergénique permet de manipuler *in vitro* le gène *clpG* de la sous-unité constitutive de CS31A sans toucher au reste de l'opéron CS31A et de vérifier *in vivo* l'expression des protéines ClpG modifiées. Elle facilite l'introduction de nouveaux sites de restriction uniques dans le gène *clpG*, par mutagénèse dirigée ou par mutagénèse au hasard. Pour la réaliser le gène *clpG* et les gènes annexes, nécessaires à la biogénèse du CS31A, ont été sous-clonés séparément dans deux plasmides vecteurs compatibles.

25 I - Construction du plasmide transportant les gènes annexes.

Le plasmide pDSPH524 dérive du plasmide pEH524 contenant l'opéron CS31A (Martin C. et al. Microbial. Pathogenesis. 1991; 10 : 429-442) délété du gène *clpG* de la sous-unité. Pour cela, pEH524 a été restreint par SphI et le fragment Sph I/SphI de 872 pb contenant la région codante du gène *clpG* a été délété après recircularisation par la T4 ligase du plasmide linéaire généré par SphI. La délétion s'étend de 60 pb

en aval du codon d'initiation ATG à 96 pb en aval du premier codon stop TAA du gène *clpG* (Girardeau J.P. et al. J. of Bacteriology. 1991, 173 : 7673-7683). pDSPH 524 est un plasmide à faible nombre de copie ayant une origine de répllication de type pSC101 et conférant la résistance au chloramphénicol. La figure 10 représente les stuctures des plasmides pEH524 et pDSPH524.

II - Construction des plasmides transportant le gène *clpG*.

1) Dans le plasmide vecteur bluescript SK(+).

- la figure 11 représente le plasmide pSTD41150.

Le fragment PstI/HpaI de 1,2 kb, porté par pEH524, contenant la région promotrice, la région codante et la région de terminaison du gène *clpG*, a été cloné dans les sites PstI/SmaI du plasmide vecteur Bluescript SK(+) (Stratagene). Dans cette construction, la transcription du gène *clpG* est sous le contrôle de son propre promoteur et orientée dans le sens inverse du sens transcriptionnel dépendant du promoteur Plac du vecteur. Le plasmide pSTD41150, résultant de ce clonage, complémente en trans le plasmide pDSPH524 pour la biogénèse du CS31A. Le site PstI est situé à 255 pb en amont du codon d'initiation ATG du gène *clpG*.

- la figure 12 représente le plasmide pDEV41155.

Le plasmide pSTD41150 contenant seulement 2 sites EcoRV a été restreint par EcoRV et le fragment EcoRV/EcoRV de 225 pb a été délété. Le premier site EcoRV est situé à 40 pb en amont du codon initiateur ATG du gène *clpG* et le second dans le polylinker du vecteur Bluescript SK(+). Le plasmide résultant de cette

construction, pDEV41155 porte le fragment EcoRV/HpaI de 0.92 kb du gène *clpG*. Ce fragment exprime la sous-unité ClpG lorsque pDEV41155 est complémenté par le plasmide pDSPH 524. pDEV41155 est un plasmide à grand nombre de copies ayant l'origine de répllication Col EI et codant pour la résistance à l'ampicilline (Ap^r).

2) Dans le plasmide vecteur pSELECT-1.

Le fragment PstI/HpaI du gène *clpG* contenant le promoteur, la région codante et la région terminatrice du gène *clpG* a été cloné dans le vecteur bluescript SK+ restreint par SmaI et PstI. Puis le fragment PstI/XbaI de ce recombinant (contenant le fragment PstI/HpaI précité) a été cloné dans le vecteur p-SELECT-1 restreint par PstI et XbaI, conduisant à l'obtention du plasmide pPSX83.

Le plasmide pSELECT-1 (Promega) est un vecteur à grand nombre de copies. Il porte le gène de résistance à la tétracycline et a une origine de répllication (col EI) différente de celle de pDSPH524.

La complémentation de CS31A est schématisée sur la figure 13, dans laquelle E représente EcoRV, P représente PstI et Xb représente XbaI. Elle fait intervenir le plasmide pDSPH524 et le plasmide pPSX83 qui contient le seul gène de la sous-unité majeure de CS31A sous le contrôle de son propre promoteur dans p-SELECT-1. Les bactéries hébergeant à la fois les plasmides pPSX83 et pDSPH524 sont CS31A positives.

F) IDENTIFICATION PRESOMPTIVE DES REGIONS DE LA SOUS-UNITE ClpG POUVANT ACCEPTER DES ADDITIONS D'ACIDES AMINES OU DES SUBSTITUTIONS HETEROLOGUES.

Pour obtenir cette information trois stratégies ont été mises en oeuvre :

- Définition des régions variables susceptibles d'accepter des modifications à partir de la comparaison des séquences primaires de la protéine CS31A avec celles des protéines K88 et F41.

5 - Recherche des épitopes continus dans la protéine CS31A. Les épitopes continus correspondent souvent à des régions variables de la protéine. L'étude de leur accessibilité aux anticorps fournit aussi une information sur leur localisation dans la protéine native.

10 - La mutagenèse insertionnelle au hasard consiste à insérer de façon aléatoire un court oligonucléotide de synthèse possédant le site de reconnaissance d'une endonucléase de restriction ("linker") dans le gène clpG. L'introduction de ce nouveau site de restriction permet d'insérer ultérieurement une séquence hétérologue. L'analyse de l'expression des protéines modifiées par complémentation intergénique *in vivo* et par immunoblotting utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la protéine ClpG, constitue la base de l'évaluation du degré de permissivité de cette protéine. Les régions permissives sont ensuite localisées et identifiées après analyse de restriction et séquençage nucléotidique.

25 I - Comparaison de séquences.

La figure 14 représente l'alignement des séquences primaires déduites des antigènes CS31A, K88 et F41. La comparaison de ces séquences indique que CS31A présente une identité de 44% avec la sous-unité de l'antigène K88 et 24% avec la sous-unité de l'antigène F41. Malgré les importantes divergences observées dans les séquences primaires de CS31A et K88, la conservation de plusieurs régions hydrophobes systématiquement associées à la présence d'un résidu proline suggère que

les deux sous-unités adoptent une conformation similaire. Les régions variables susceptibles d'être permissives sont délimitées par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 10 et 58 pour la région B, 123 et 164 pour la région C et 183 et 257 pour la région D.

II - Recherche des épitopes continus dans la protéine CS31A.

Les réponses immunitaires étant différentes contre une protéine présentée sous forme native ou dénaturée, les épitopes continus ont été définis soit avec des anticorps dirigés contre la sous-unité dénaturée, soit avec des anticorps dirigés contre la protéine native de haut poids moléculaire.

1) Définition des épitopes continus des sous-unités dénaturées.

La présence d'épitopes continus est recherchée en mesurant la réactivité des antisérums polyclonaux préparés chez 4 lapins (L1, L2, L3, L4) contre la protéine dénaturée vis à vis des 257 nonapeptides chevauchants qui recouvrent la séquence CS31A.

La figure 15 représente en A le profil de réactivité des nonapeptides vis à vis de l'antisérum L2 dirigé contre la protéine CS31A dénaturée; la figure 15 représente en B le profil de réactivité des nonapeptides vis à vis d'un antisérum aspécifique témoin. Cet antisérum témoin est celui d'un lapin immunisé selon le même protocole mais contre une autre protéine, la protéine OmpA.

La figure 16 représente les régions immunoréactives reconnues par les antisérums anti-CS31A dénaturé produits chez les quatre lapins.

Les figures 15 et 16 montrent que les 4 antisérums reconnaissent essentiellement 6 régions contenant les épitopes continus de la molécule dénaturée.

5 Les peptides suivants ont été retenus : 10-19; 37-58; 88-106; 144-172; 184-219 ainsi que la région C-terminale (232-257). Individuellement les sérums reconnaissent des séquences plus courtes (5 à 7 résidus).

10 A ces régions immunodominantes reconnues par tous les animaux, s'ajoutent des régions reconnues seulement par certains antisérums. C'est le cas des peptides 37-44 et 200-207 pour le lapin L1 et 84-93 chez les lapins L3 et L4.

15 2) Définition des épitopes continus de la protéine native.

Ces épitopes ont été définis par le même procédé, mais la réactivité des peptides est observée avec des antisérums préparés contre la protéine native de haut poids moléculaire.

20 La figure 17 représente les régions immunoréactives reconnues par les antisérums anti-CS31A natifs produits chez les lapins (N1) et (N2). La séquence soulignée 176-196 correspond à la région immunodominante de la protéine CS31A native.

25 Les antisérums de deux lapins reconnaissent seulement la région 190-197 qui constitue le seul épitope continu présent sur la protéine native.

30 III - Définition de l'accessibilité des épitopes continus.

La mesure de l'antigénicité des peptides définis précédemment permet de préciser leur

accessibilité à la surface de la molécule native. Deux méthodes différentes ont été utilisées :

5 1) Première méthode : Modification du profil d'épitope scanning après absorption de l'anticorps polyclonal par la protéine native.

Trois situations sont observées, comme le montre l'exemple de la figure 18 représentant les profils de peptide scanning obtenus avec les antisérums anti-CS31A, avant absorption par la protéine CS31A native (pics en blanc), et après absorption (pics en gris); en A : lapin L1, en B : lapin L2 :

10 - Régions 98-106 et 151-160 : la réactivité de l'antisérum absorbé n'est pas modifiée. Les peptides ne sont pas accessibles à la surface de la molécule.

15 - Région 184-191 avec le sérum du lapin L2 et région 200-207 avec le sérum du lapin L1, la réactivité de l'antisérum est totalement abolie. Les peptides sont accessibles et les anticorps correspondants ont une bonne affinité.

20 - Régions 10-19, 46-58, 92-99, 235-245 : la réactivité vis à vis des peptides est diminuée plus au moins fortement. L'accessibilité est partielle ou l'affinité des anticorps est faible pour le peptide
25 présenté dans la protéine native.

2) Seconde méthode : Capture d'un antipeptide par la protéine native.

Le principe de la mesure consiste soit :

30 - à mesurer en présence de la protéine native, la quantité d'antipeptide capturée par le peptide correspondant absorbé sur une phase solide (Accessibilité ELISA), soit,

- à mesurer directement la quantité d'antipeptide capturée par la protéine native immobilisée sur nitrocellulose ou sur plastique.

5

a) Production d'antipeptides.

10

Cinq antipeptides ont été produits contre cinq peptides synthétiques de 15 résidus, correspondant aux régions immunodominantes définies précédemment. Chaque antipeptide a été préparé chez 2 lapins comme décrit dans matériel et méthodes. Le tableau 3 ci-après présente la séquence, la position et les peptides de la région correspondante.

Tableau 3

Peptide	Séquences positions	anti-peptide	Positions des nonapeptides réactifs	Nonapeptide le plus réactif
Y-15-A	(Y)-GDSKLLTITOSEPA 44 57	Y-15-A(H)	42-57	GDSKLLTIT
Y-15-D	(Y)-GDNGKGFFELPMKD 97 110	Y-15-D(K)	99-112	FELPMKDDS
D-15-I	DNTSIYYGGLVSPA 148 162	D-15-I(C)	144-165	(I)YYGGLVSPA
G-15-Q	GOLOAVNPNAAGNRGQ 185 199	G-15-Q(F)	184-201	QLQAVNPNA
T-15-P	TFTNPVVSTTOWSAP 235 249	T-15-P(A)	238-253	STTOWSAPL

15

Les cinq peptides sont localisés dans la séquence primaire sur la figure 19.

20

b) Contrôle de la spécificité et titrage des antipeptides.

Ce contrôle est réalisé en ELISA par capture d'anticorps sur peptides fixés sur plaques Immulon II

(0,5 µg/puits). Le titre et la réactivité croisée des antipeptides sont présentés dans le tableau 4 ci-après.

Tableau 4

Peptide	Y-15-A	Y-15-D	D-15-I	G-15-Q	T-15-I
Anti-peptide					
Y-15-A (H)	>3200	0	0	0	0
Y-15-D (J)	0	>16000	0	0	500
Y-15-D (K)	0	>32000	0	0	500
D-15-I (C)	0	0	8000	0	0
D-15-I (D)	0	0	>32000	500	250
G-15-Q (E)	128	128	128	>32000	64
G-15-Q (F)	0	32	0	32000	0
T-15-P (A)	0	0	0	0	4000
T-15-P (B)	128	250	64	32	4000
Sérum préimmun	250 (H)	250 (J+K)	64 (C+D)	64 (E+F)	128 (A+B)

Dans le tableau 4, les lettres entre parenthèses correspondent à l'identification du lapin immunisé. Pour chaque peptide, deux antipeptides ont été produits, à l'exception du peptide Y-15-A.

c) Accessibilité ELISA.

Afin d'éviter les problèmes liés aux différences d'affinité des antipeptides entre les antigènes en compétition (protéine native/peptide), les antipeptides sont d'abord absorbés sur la protéine native (ou sur des bactéries qui la produisent). Après élimination des immunocomplexes par centrifugation, le titre résiduel de l'antipeptide est mesuré par capture d'anticorps sur le peptide correspondant immobilisé en plaque Immulon II. Les antipeptides ont été utilisés à des dilutions, définies d'après les courbes de

titration, qui correspondent à une diminution de 50% de la D.O. à 405 nm.

Les résultats de l'accessibilité des épitopes continus de la protéine CS31A sont présentés sur le tableau 5 ci-après.

5

Tableau 5

Séquences	Position	Accessi- bilité Pepscan (graphe)	Accessi- bilité Pepscan (indice)	Accessi- bilité anti- peptide	Conclu- sion accessi- bilité
FDMNGTITA MNGTITADA	10-18 12-20	+(L1) +(L2) -(L1.8)	- - -		(+)
FNNTIKEMT	35-43	+(L1) -(L1.8)	+		(+)
LTITQSEPA DSKLLTITTQ	49-57 45-53	+(L1) +(L2) +(L1.8)	++ - -		+
(Y)-GDSKLLTITQSEPA (Y-15-A)	44-57			+	+
VGVGAIPLI	73-81	+(L2)	++		(+)
GNGVALQSS GNGVALQSS	88-96	+(L1) +(L2) +(L1.8)	++ - -		(+)
DNGKGFFEL DNGKGFFEL	98-106	-(L1) -(L2) -(L1.8)	- - -		-
(Y)-GDNGKGFFELPMKD (Y-15-D)	97-100			-	-
TSVASGNT	142-150	-(L1) -(L1.8)	- -		-
YYGGLVSPA IYYGGLVSP	153-161 152-160	-(L1) +(L2) -(L1.8)	+	++	
DNTSIYYGGLVSPAI (D-15-I)	148-162			-	-
GKDAASAVS	165-173	-(L1) -(L1.8)	+++		(+)
LGQLQAVNP QVNKNSAVS	184-192 199-207	+++ (L2) +(L1) +(L1.8)	+++ +++		+++ +++
GQLQAVNPAGNRGQ (G-15-Q)	185-199			+++	+++

Tableau 5 (suite)

Séquences	Position	Accessi- bilité Pepscan (graphe)	Accessi- bilité Pepscan (indice)	Accessi- bilité anti- peptide	Conclu- sion accessi- bilité
VMTTGDVIA VMTTGDVIA	211-219	+(L1) +(L2) -(L1.8)	- +++		(+)
ALGIDQGQT	223-231	+(L2)	+++		(+)
NPVVSTTQW TFTNPVVSTT	238-246 235-243	+(L1) +(L2) -(L1,8)	+ +		
TFTNPVVSTTQWSAP (T-15-P)	235-249			++	++

La figure 20 représente la compétition ELISA pour mesurer l'accessibilité des peptides dans la protéine native CS31A (courbe essai : *, courbe témoin : o).

Trois situations sont observées :

- Avec les antipeptides G15Q (185-199) et T15P (235-249), on remarque une diminution de D.O. proportionnelle à la quantité de protéine native en compétition avec le peptide. Les antipeptides sont absorbés par les régions correspondantes sur la protéine native. La spécificité du système est vérifiée par la stabilité du titre de l'antipeptide en présence soit d'une protéine étrangère (BSA) soit de bactéries hébergeant un plasmide délété dans la région portant le gène de structure (pDSPH524).

- Avec les antipeptides Y15A (44-57), l'absorption de l'antipeptide n'est mesurable qu'aux fortes concentrations de protéine native. Ceci indique soit, une accessibilité partielle dans la protéine native, soit une faible affinité de l'antipeptide pour la protéine native.

- Avec les antipeptides Y15D (97-110) et D15I (148-162). Les courbes essai (•), et témoin (o) sont parallèles, il n'y a pas de relation entre le titre résiduel de l'antipeptide et la quantité de protéine native utilisée pour la compétition.

d) Capture d'antipeptide par la protéine native en DOT-BLOT.

Des membranes de nitrocellulose sur lesquelles est déposée une série de dilutions (120 à 0,4 ng) de protéine CS31A purifiée (native ou dénaturée par la chaleur) sont mises en contact avec les anticorps suivants :

- chacun des cinq antipeptides (dilutions entre 1/50 et 1/500),

- l'antisérum polyclonal dirigé contre les sous-unités purifiées dénaturées (dilution 1/500),

- un antisérum (31AL) qui ne reconnaît que la protéine native (dilution 1/100).

La fixation des anticorps sur les antigènes immobilisés est mesurée comme décrit dans matériel et méthodes.

La figure 21 est une photographie des membranes qui montre la réactivité des différents anticorps vis à vis de l'antigène immobilisé.

Ligne A : Les anticorps sont dirigés contre la protéine dénaturée. On montre que la même quantité d'antigène (natif/dénaturé) est immobilisée sur la membrane.

Ligne B : L'antisérum 31AL indique que l'antigène non dénaturé par la chaleur est bien immobilisé sous forme native.

Ligne C : L'antipeptide G15Q reconnaît le peptide (185-200) de la protéine native ou dénaturée. Le

peptide est donc accessible et l'antipeptide a une bonne affinité quelle que soit la conformation de la molécule.

Ligne D : Les antipeptides Y15A ; D15I et T15P reconnaissent mieux la forme dénaturée que la forme native quand ils sont faiblement dilués (1/50). A plus forte dilution (1/500) aucune réaction n'est observée. La plus faible réactivité des peptides dans la protéine native est liée, soit à sa faible accessibilité, soit à la faible affinité de l'antipeptide.

Ligne E : L'antipeptide Y15D ne reconnaît que l'antigène dénaturé. Le peptide 97-110 ne semble pas accessible dans la protéine native.

3) Conclusions sur l'étude d'accessibilité des épitopes continus identifiés dans CS31A et les propriétés des régions contenant ces épitopes continus.

Les méthodes utilisées donnent de bonnes indications sur l'accessibilité des peptides 44-57, 97-110 et 185-199. Par contre, les résultats ne permettent pas de définir clairement l'accessibilité des deux autres peptides (tableau 5).

- Peptide 44-57 : Les résultats obtenus indiquent que cette région est accessible dans la protéine native. Cependant l'anti peptide (Y15A) semble avoir une faible affinité pour le peptide dans son environnement naturel.

- Peptide 97-110 : Tous les résultats indiquent que cette région n'est pas accessible dans la protéine native.

- Peptide 185-199 : Tous les résultats indiquent que cette région est très accessible et que l'antipeptide correspondant (G15Q) a une bonne affinité pour le peptide quelle que soit sa conformation. De plus la disparition de la réactivité des régions 183-191 et 199-207 observée par "épitope scanning" après absorption

des anticorps par la protéine native indique qu'une large région comptant au moins 24 résidus (183-207) paraît facilement accessible aux anticorps.

5 - Peptide 148-162 : Les résultats indiquent généralement la faible accessibilité de cette région dans la protéine native. Cependant la réactivité en Dot-Blot de l'antipeptide D15I vis à vis de la protéine native est en contradiction avec les autres résultats. L'accessibilité de cette région reste à définir, car les
10 résultats ne permettent pas de trancher entre la non accessibilité de la région ou la mauvaise affinité de l'antipeptide D15I.

 - Région C-Terminale : Cette région semble accessible, mais la superposition des épitopes continus
15 dans cette région ne permet pas une bonne définition de l'accessibilité de chacun d'eux.

Toutes les informations recueillies sur les propriétés des régions contenant les épitopes continus sont présentées dans le tableau 6 ci-après.

Tableau 6

Région immuno dominante	Position des épitopes continus accessibilité des épitopes <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="width: 10px; height: 10px; border: 1px solid black; background-color: white;"></div> - <div style="width: 10px; height: 10px; border: 1px solid black; background-color: #cccccc;"></div> + <div style="width: 10px; height: 10px; border: 1px solid black; background-color: #808080;"></div> +++ </div>	Hydrophilie	Flexibilité
10-19	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>Région conservée</div> <div>Région variable</div> </div>	+	+
38-58	<p>Accessibilité de Peptide Y15A l'antipeptide +</p>	+	+
88-106	<p>Accessibilité de Peptide Y15D l'antipeptide -</p>	-	-
144-172	<div style="text-align: center;">V2</div> <p>Accessibilité de Peptide D15I l'antipeptide -</p>	+	+
184-220	<div style="text-align: center;">V3</div> <p>épitope "natif" Accessibilité de Peptide G15Q l'antipeptide +++</p>	+	+
223-245	<p>Accessibilité de Peptide T15P l'antipeptide +</p>		++

4) Propriétés générales des régions contenant les épitopes continus (Tableau 6).

- 5 - Région 10-19 : cette région est fortement immunogène et tous les sérums dirigés contre la protéine dénaturée (anti-D) réagissent contre elle. L'épitope est localisé dans une région variable, faiblement hydrophile, flexible et accessible.
- 10 - Région 38-58 : cette région est très immunogène. Les différents sérums anti-D permettent de définir trois épitopes chevauchants localisés dans une large région variable interrompue par 4 résidus conservés. La région est hydrophile, très flexible et accessible aux anticorps.
- 15 - Région 74-80 : cette région est immunogène chez certains animaux, l'épitope reconnu par les sérums anti-D est situé dans une courte région variable flanquée de régions très conservées. La région contenant l'épitope est hydrophobe et non flexible, elle est cependant accessible aux anticorps.
- 20 - Région 88-106 : cette région très immunogène est reconnue par tous les sérums anti-D. On peut définir trois épitopes situés dans la région variable adjacente au cluster P3. L'épitope 88-99 est situé dans une région hydrophile, flexible et accessible, par contre l'épitope immédiatement adjacent 98-106 fait partie d'une région hydrophobe, non flexible et non accessible aux anticorps. L'antipeptide Y15D dirigé contre la séquence 97-110 ne réagit pas contre la protéine native.
- 25 - Région 144-172 : la séquence 151-160 est très immunogène chez tous les animaux, les séquences 144-151 et 165-172 sont reconnues par un seul animal. L'épitope 151-160 est situé dans une région très hydrophobe non flexible. Les autres séquences sont hydrophiles mais peu flexibles. Aucun des épitopes n'est
- 30
- 35

antigénique dans la protéine native. L'antipeptide D15I (148-162) n'est pas fixé par la protéine.

5 - Région 184-220 : C'est la région la plus immunoréactive de la protéine, elle contient le seul épitope continu (190-197) de la protéine native. La région 190-197 contient la séquence NPN qui est susceptible de former une torsion de la chaîne polypeptidique qui pourrait expliquer cette forte immunoréactivité. Tous les animaux reconnaissent la région 184-197, mais la région 200-207 ne réagit que chez un seul animal. L'épitope 184-191 est situé en aval de la séquence NPN dans une région conservée, hydrophobe non flexible mais accessible aux anticorps. L'antipeptide G15Q (185-199) réagit fortement contre la protéine native. L'épitope 200-207 est localisé dans la région variable (V3) hydrophile, flexible et facilement accessible aux anticorps. La région 211-219 est fortement immunogène chez tous les animaux, elle est située dans V3 dans une partie hydrophobe flexible non accessible.

20 La région 184-220 semble donc très immunogène, son antigénicité est limitée à la partie amont (184-207).

25 - Région 223-245 : La région C-terminale est fortement immunoréactive mais la superposition des nombreux épitopes complique leur définition. L'épitope 223-231 est exactement situé dans une région variable faiblement hydrophile, mais très flexible. L'épitope 235-245 est situé dans une région variable hydrophobe peu flexible. L'étude d'accessibilité avec l'antipeptide T15P (235-249) indique que toute la région est antigénique dans la protéine native.

30

5) Conclusion générale sur l'étude immunostructurale.

Les conclusions précédentes font apparaître les points suivants :

5 - L'étude immunostructurale localise clairement les épitopes continus dans des régions variables, généralement flexibles, hydrophiles et accessibles aux anticorps dans la protéine native.

10 - Les insertions d'épitopes étrangers par mutagenèse dirigée dans les régions variables immunoréactives permettront, à condition qu'elles soient permissives, de placer les séquences étrangères dans un environnement conformationnel favorable (flexibilité, accessibilité) à une bonne présentation au système
15 immunitaire.

 - A condition qu'elles soient permissives, les régions variables immunoréactives 10-19 ; 38-58 ; 88-106 ; 144-172 ; 184-220 et 223-245 pourront être choisies pour insérer des épitopes étrangers.

20 - La région V3 (184-220) qui possède le seul épitope continu de la protéine native possède les propriétés immunologiques (immunogénicité et antigénicité) les plus favorables pour la présentation d'épitopes étrangers.

25

IV - Mutagenèse insertionnelle au hasard dans la protéine ClpG.

30 1) Insertion au hasard de linkers EcoRI et de séquences hétérologues dans le gène clpG.

L'introduction par mutagenèse au hasard d'un site unique de restriction EcoRI dans le plasmide pDEV41155 transportant le gène clpG est schématisée sur la figure 22.

Le plasmide pDEV41155 est partiellement hydrolysé par la Dnase I en présence de Mn++ de telle manière qu'environ 1/3 des molécules soient obtenues sous forme linéaire. On évite ainsi des coupures multiples du plasmide par la Dnase I. Les extrémités protubérantes de pDEV41155 ainsi linéarisé sont transformées en bouts francs par l'action de la T4 DNA polymérase et du fragment klenow de l'ADN polymérase de E.coli. Les molécules d'ADN linéaire de 3,8 kb ayant subi l'action des polymérases ont été ensuite isolées et purifiées à partir de gels d'agarose. La recircularisation des plasmides a été effectuée en présence d'un excès de linkers EcoRI non phosphorylés et de la T4 DNA ligase. Cinq linkers EcoRI de différentes tailles (8,10 et 12 mer.) ont été utilisés afin d'avoir au moins une insertion ne modifiant pas le cadre de lecture du gène clpG :

GGAATTCC (8 mer)
GCGAATTCGG (10 mer)
CGGAATTCCG (10 mer)
CCCGAATTCGGG (12 mer)
CCGGAATTCCGG (12 mer)

Après transformation de la souche E.coli DH5α, le mélange de transformation est directement mis en culture. L'ADN plasmidique total extrait à partir de cette culture est restreint par l'enzyme EcoRI. Un mélange d'ADN linéaire de 3,8 kb est récupéré et purifié, par électrophorèse en gel d'agarose. Cette étape de digestion par EcoRI a permis d'isoler uniquement les plasmides pDEV41155 ayant inséré les linkers EcoRI monomériques et d'écarter ceux dépourvus de linkers EcoRI ou ceux ayant incorporé des linkers EcoRI multimériques.

Les plasmides linéaires renfermant un site EcoRI, sont soumis à l'action de la T4 DNA ligase en

présence d'une cassette-Km^r codant pour l'aminoglycoside 3'-phosphotransférase qui confère la résistance à la kanamycine.

La cassette Km^r représentée à la figure 23 avec ses sites de restriction multiples et symétriques (MCS) utilisée ici est le fragment EcoRI/EcoRI de 1,28 kb provenant du plasmide pUC4K (Viera J and Messing J. 1982. Gene 19: 259) et contenant le transposon Tn 903. Les extrémités 5' et 3' du gène de résistance comportent un polylinker possédant du côté distal de ce gène le site EcoRI et du côté proximal le site PstI. Le clonage de la cassette Km^r dans le site unique EcoRI du plasmide pDEV41155 ayant incorporé un linker EcoRI, est illustré par la figure 24. Les clones obtenus après transformation de la souche DH5 α , sont sélectionnés sur leur double résistance à la kanamycine (marqueurs des sites d'insertion) et à l'ampicilline (marqueur du plasmide vecteur). Ainsi, 830 clones Ap^r Km^r hébergant le plasmide pDEV41155 porteur de la cassette Km^r ont été isolés. Les plasmides mutés ayant une insertion affectant soit l'activité de la bêta lactamase soit la répllication des plasmides ne sont pas retrouvés. Cette sélection favorise l'obtention de mutants ayant la cassette Km^r dans le gène clpG ou dans le reste du vecteur.

Pour sélectionner les insertions de la cassette Km^r situées uniquement dans le gène clpG, celui-ci a été excisé et reclone dans le même plasmide vecteur de départ n'ayant pas été traité par la Dnase I. Pour cela, les plasmides pDEV41155 transportant la cassette Km^r ont été digérés à la fois par ApaI et SacI (figure 24). Les sites ApaI et SacI sont respectivement situés à 78 pb en amont et 893 pb en aval du codon d'initiation ATG du gène clpG.

La figure 24 indique le protocole de sélection positive des insertions des linkers Eco RI et du polylinker Eco RI-PstI-Eco RI dans le gène *clpG*.

5 Les fragments *ApaI*/*SacI* de 2,25 Kb contenant le gène *clpG* muté par l'insertion de la cassette *Km^r* sont purifiés à partir de gels d'agarose et clonés dans les sites *ApaI* / *SacI* du vecteur Bluescript SK. Après transformation de la souche *E.coli* DH5 α , 867 clones *Km^r*, *Ap^r* ayant la cassette *Km^r* dans le gène *clpG* ont été
10 sélectionnés.

La présence de sites de restriction multiples et symétriques aux extrémités de la cassette *Km^r* a été mise à profit pour introduire des séquences hétérologues de différentes tailles dans le gène *clpG*
15 après excision de la cassette. Cette excision a été réalisée à partir de l'ADN plasmidique extrait des clones *Ap^r* *Km^r* par coupure avec *EcoRI* ou *PstI*. La figure 24 illustre deux constructions simples conduisant à l'excision de la cassette *Km^r* par délétion. La
20 recircularisation de l'ADN linéarisé par *EcoRI* conduit à l'insertion de 8 à 12 bp et celle de l'ADN linéarisé par *PstI* aboutit à l'insertion de 50 à 54 pb.

Au niveau de la protéine *ClpG* cela correspond à une insertion de 3 ou 4 acides aminés dans
25 la première situation et de 17 à 18 acides aminés dans la seconde situation. Après excision de la cassette, les plasmides recircularisés sont transférés dans la souche *E.coli* DH5 α contenant le plasmide pDSPH524 afin de tester l'expression des gènes *clpG* mutés.

30 La figure 25 représente les séquences nucléotidiques résultant des insertions des linkers *EcoRI* (à gauche de la figure) et du polylinker *EcoRI*-*PstI*-*EcoRI* (à droite de la figure) dans le gène *clpG* et leurs séquences peptidiques correspondantes. Les trois
35 séquences peptidiques correspondant aux trois cadres de

lecture possibles d'une même séquence d'ADN sont déduites à partir de chacun des cinq linkers EcoRI utilisés.

5

2) Expression des gènes clpG mutés.

La permissivité de la protéine ClpG a été évaluée par un test de complémentation intergénique *in vivo* permettant de savoir si les protéines ClpG modifiées par les différentes insertions de séquences hétérologues de 3 à 18 acides aminés sont toujours fonctionnelles pour la biogénèse des polymères de surface CS31A.

Au total 5895 clones ont été analysés par immunoblotting *in situ* sur colonies avec un antigène polyclonal spécifique du CS31A natif. Ainsi, 739 clones (12,5 %) se sont révélés positifs pour la production du CS31A. Ces résultats indiquent que les protéines ClpG ayant incorporées 3 à 18 acides aminés sont correctement exportées et intégrées dans la structure polymérique du CS31A et qu'il existe des régions permissives dans la protéine ClpG.

3) Localisation des régions permissives de la protéine ClpG.

Un mélange de plasmides recombinants extraits des 739 clones positifs pour la biogénèse du CS31A a été soumis à l'analyse de restriction. La localisation du site EcoRI dans le gène clpG muté par rapport à d'autres sites de restriction uniques (XhoI et XbaI) existants sur le plasmide vecteur de part et d'autre du gène clpG (figure 12) a permis de positionner les insertions de 3 à 54 pb dans ce gène. Différentes régions de la protéine ClpG tolérant l'addition de 3 à 18 acides aminés supplémentaires ont pu ainsi être identifiées.

Une carte des insertions permissives a été établie. La figure 26 représente la séquence de la protéine ClpG et indique la localisation des insertions des linkers EcoRI (•) et du polylinker EcoRI-PstI-EcoRI (♦). Les flèches verticales indiquent les positions approximatives des insertions permissives dans la protéine ClpG. La localisation des sites permissifs est déterminée par analyse de restriction. Les régions (I) et (II) représentées par des rectangles désignent les deux principales régions permissives. Les zones hachurées indiquent les épitopes linéaires de la protéine ClpG.

Les résultats montrent que les 44 insertions répertoriées se répartissent tout le long de la séquence protéique de ClpG. Deux régions principales semblent toutefois se dégager dans lesquelles un grand nombre d'insertions ont été positionnées. La première région (I) localisée à l'extrémité N-terminale entre les acides aminés 11 et 36 contient 13 insertions. La seconde région (II) localisée dans la partie centrale de la protéine ClpG entre les acides aminés 125 et 156 contient 16 insertions.

En conclusion, les résultats obtenus démontrent qu'il est possible d'insérer 3 à 18 acides aminés dans la protéine ClpG sans affecter la biogénèse des polymères de surface CS31A.

V - Conclusion générale concernant les zones potentiellement permissives de la protéine CS31A.

La synthèse des résultats obtenus selon 3 méthodes complémentaires pour identifier les zones accessibles à la surface de la molécule et potentiellement permissives pour les insertions ou substitutions hétérologues dans la protéine CS31A, est la suivante :

- La région A identifiée par mutagénèse insertionnelle au hasard accepte l'introduction de 4 à 20 acides aminés hétérologues.

- La région B avec sa région variable V1 et ses peptides immunogènes 10-19 et 38-58 antigéniques dans la forme native est permissive puisque des insertions hétérologues ont été obtenues par mutagénèse au hasard, en particulier au niveau du peptide 10-19.

- La région C avec sa région variable V2 contient dans sa partie terminale un épitope continu (peptide 151-160) mais qui n'est pas antigénique dans la protéine native. Toutefois plusieurs insertions ont été obtenues par mutagénèse au hasard et la permissivité de cette région paraît donc intéressante.

-La région D avec sa région variable V3 contient le seul épitope continu antigénique et immunogène dans la protéine sous forme native, ce qui en fait une région immunodominante majeure. Dans sa partie C-terminale plusieurs peptides sont immunogènes et antigéniques dans la forme dénaturée de la protéine. Enfin quelques insertions ont été obtenues par mutagénèse au hasard.

G) CHOIX DES EPITOPES VIRAUX.

Cinq épitopes ont été choisis pour ces exemples.

Il s'agit des épitopes C et A de la glycoprotéine S du virus de la gastro-entérite transmissible (GET) du porcelet, d'un épitope de la protéine VP6 du rotavirus bovin, de l'épitope C3 de la protéine de capsid VP1 du poliovirus de type 1 (Mahoney) et d'un épitope de la protéine de capsid VP1 du virus de la fièvre aphteuse (FMDV). Les ADN codant pour ces épitopes sont obtenus par synthèse chimique.

Les codons choisis sont ceux les plus fréquemment utilisés dans le gène *clpG*. Les extrémités des molécules d'ADN codant pour un épitope varient en fonction de la localisation de l'insertion afin qu'elles soient compatibles avec les sites de restriction introduits dans *clpG*.

La figure 27 indique les séquences des oligonucléotides de synthèse utilisés, codant pour les épitopes GET, Rotavirus, Polio et FMDV. La séquence de l'épitope lui même est représentée par des lettres en relief.

H) CLONAGE DE L'ADN CORRESPONDANT AUX EPITOPES VIRAUX ET EXPRESSION DES PROTEINES RECOMBINANTES.

I - Après mutagenèse dirigée.

Les régions V2 (acide aminé 123 à acide aminé 150) et V3 (acide aminé 183 à acide aminé 221) ont été choisies dans ces exemples pour l'insertion d'épitopes. Des sites de restriction uniques ont été créés aux endroits désirés par mutagenèse dirigée en utilisant des oligonucléotides synthétiques porteurs de la mutation choisie. Pour cela, la méthode de l'ADN partiellement simple brin et les vecteurs pMa 5-8 et pMc 5-8 ont été utilisés.

Le fragment Hind III-XbaI de pPSX83 a été cloné dans ces vecteurs, conduisant à l'obtention des plasmides pMCHX et pMaHX. Après mutagenèse, les fragments HindIII-XbaI provenant de pMCHX muté et pMaHX muté ont de nouveau été clonés dans p-SELECT-1.

La présence des mutations souhaitées est confirmée par analyse de restriction et par séquençage nucléotidique par la méthode de Sanger.

L'expression des protéines recombinantes est vérifiée par des tests immunologiques sur bactéries entières ou des extraits bruts à 60°C (Immunodots et Western blot).

5

1) Manipulations de V2.

Les modifications de la région V2 sont indiquées dans la figure 28. Dans les mutants 2 et 5, l'acide aminé 131, tyrosine, est remplacé par un résidu thréonine. Dans le mutant 6, les acides aminés 131 à 141 ont été délétés.

10

Les plasmides mutants sont introduits par transformation dans une souche contenant pDSPH 524 et la présence de CS31A est recherchée par tests immunologiques sur extraits à 60°C après électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (Western blot).

15

Les mutants 1 à 5 produisent CS31A en quantité comparable à la souche témoin hébergeant pPSX83 + pDSPH 524.

20

Le mutant 6 ne produit pas de CS31A comme le montre la figure 29.

a) Introduction des épitopes et expression des protéines recombinantes.

25

- un ADN synthétique codant pour l'épitope du GET possède des extrémités compatibles avec les sites de restriction HpaI/SpeI (figure 27d). Il a remplacé le fragment HpaI et SpeI du gène clpG des mutants 3 et 4 générant respectivement les plasmides pGC32 et pGC19 (figure 30b et 30c).

30

- un ADN synthétique codant pour l'épitope du GET possède deux extrémités compatibles avec SpeI (figure 27a). Il a été inséré en phase dans le site SpeI du gène clpG des mutants 2 et 4, générant respectivement les plasmides pGC1 et pGC4 (figure 30a et 30c). Il a

35

également remplacé le fragment SpeI/SpeI du mutant 5, générant le plasmide pGC44 (figure 30d).

- un ADN synthétique codant pour l'épitope du FMDV (figure 27g) possède des extrémités compatibles avec HpaI et SpeI. Il a remplacé le fragment de restriction HpaI/SpeI du gène clpG du mutant 2, générant le plasmide pF1 (figure 30a).

Dans la figure 30 on a indiqué pour chacun des mutants la synthèse (+) ou non (-) de la protéine et la production (+) ou non (-) de la capsule CS31A.

Les plasmides pGC32, pGC19, pGC44, pGC1, pGC4 et pF1 sont introduits individuellement dans la souche de complémentation. Des Western blot sont effectués sur des extraits à 60°C provenant de ces souches. Les anticorps polyclonaux anti-CS31A ou antipeptide G15Q décrits précédemment ne reconnaissent pas un polypeptide avec le poids moléculaire attendu mais avec un poids moléculaire plus élevé d'environ 60 kDa. Dans des expériences d'immunodots, les bactéries entières sont CS31A négatives. La sous-unité ClpG est donc synthétisée mais n'est pas exportée et polymérisée à la surface bactérienne. Elle est certainement bloquée dans le périplasme en association avec une autre protéine qui n'a pas encore été identifiée.

La figure 31 est une photographie d'un "Western blot" réalisé à partir d'extraits à 60°C concentrés 10 fois de bactéries hébergeant les mutants 1 à 6 (+pDSPH 524) et de l'anticorps polyclonal anti-CS31A.

Ce résultat n'est pas incompatible avec l'utilisation vaccinale de telles bactéries recombinantes.

b) Conclusions pour la région V2.

La région V2 apparaît globalement permissive d'après les expériences de mutagenèse au hasard. Cependant certains acides aminés doivent être importants puisque l'introduction (insertions et substitutions) des séquences nucléotidiques codant pour différents épitopes perturbe la biogénèse de CS31A. Il est nécessaire de déterminer plus précisément dans cette zone la localisation exacte des sites permissifs.

2) Manipulation de V3.

Les modifications de la région V3 sont indiquées dans la figure 32; dans cette figure les nucléotides et les acides aminés marqués d'une étoile sont ceux qui ont été modifiés par mutagenèse.

Dans le mutant 7, le résidu glutamine en position 186 est remplacé par un résidu glutamate. Un site de restriction SacI est ainsi créé. De plus, un résidu glutamine en position 199 est remplacé par un résidu leucine. Un site de restriction SpeI est ainsi créé.

Dans le mutant 8, un site de restriction Hpa I est créé au niveau du codon valine en position 190. Un résidu asparagine en position 203 est remplacé par un résidu thréonine, créant ainsi un site de restriction Spe I.

Dans les mutants 9 et 10, un résidu asparagine en position 203 est remplacé par un résidu thréonine, créant ainsi un site de restriction SpeI. De plus dans le mutant 9 un résidu valine en position 217 est remplacé par un résidu leucine. Un site de restriction BglII est ainsi créé.

Les plasmides mutants sont introduits par transformation dans une souche hébergeant pDSPH 524 et la présence de CS31A est recherchée par tests

immunologiques sur bactéries entières et sur extraits à 60°C après électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant. Les mutants 8, 9 et 10 produisent CS31A en quantité comparable à la souche témoin hébergeant pPSX83 + pDSPH 524. Le mutant 7 en produit légèrement moins.

La figure 33 est une photographie d'un "Western blot" réalisé à partir d'extraits à 60°C concentrés 10 fois et de l'anticorps polyclonal anti-CS31A; en 1 : pPSX 83 + pDSPH 524 ; en 2 : mutant 9 + pDSPH 524 ; en 3 : mutant 8 + pDSPH 524 ; en 4 : mutant 7+ pDSPH 524.

a) Introduction des épitopes et expression des protéines recombinantes.

- Dans le mutant 9 :

Cinq ADN synthétiques dont 2 codant pour l'épitope C du GET, un pour l'épitope A du GET, un pour l'épitope du rotavirus et le dernier pour l'épitope polio, et ayant des extrémités cohésives SpeI et BglII (figure 27), ont remplacé le fragment SpeI/BglII du mutant 9, générant respectivement les plasmides pGG103, pGP105, pGA102, pR104 et pP101 (figure 34b).

Dans la figure 34 on a indiqué la synthèse (+) ou non (-) de la protéine, la production (+) ou non (-) de la capsule CS31A.

En Western blot ou en dot-blot, les sous-unités recombinantes CS31A/épitope sont très bien reconnues par les polyclonaux anti-CS31A quoique plus faiblement pour pGA102 et pR104. De plus, la sous-unité hybride codée par pGA102 a un poids moléculaire plus faible que la sous-unité sauvage. La figure 35 est une photographie d'un "Western blot" réalisé à partir d'extraits concentrés 10 fois de bactéries hébergeant

certaines constructions réalisées dans la région V3 et d'un antisérum polyclonal anti-CS31A.

Les bactéries entières hébergeant pGG103 ou pGP105+ pDSPH 524 sont reconnues par un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope C du GET.

- Dans le mutant 8 :

Trois ADN synthétiques, codant l'un pour l'épitope polio, le second pour l'épitope C du GET, et le troisième pour l'épitope FMDV, et ayant des extrémités compatibles HpaI et SpeI (figure 27), a remplacé le fragment de restriction HpaI/SpeI du mutant 8, générant respectivement les plasmides pP688, pGP684 et pF681 (figure 34a).

Les bactéries hébergeant pP688 + pDSPH 524 ou pF 681 + pDSPH 524 sont très faiblement reconnues par les anticorps polyclonaux CS31A. En Western blot, les sous-unités recombinantes sont également reconnues de façon plus faible que la sous unité témoin. Par contre les bactéries hébergeant pGP684 + pDSPH524 sont fortement reconnues par les anticorps polyclonaux anti-CS31A et par l'anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope C du GET.

- Dans le mutant 10 :

Un ADN synthétique de séquence :

XhoI

CT AGC GAC TCG AGC TTC TTT TCG TAC GGT GAG ATT CCT AGT
T S D S S F F S Y G E I P S
codant pour l'épitope C du GET (S D S S F F S Y G E I P)
et ayant des extrémités compatibles SpeI a été inséré dans le site SpeI du mutant 10, générant le plasmide pGC326. Cet ADN synthétique comporte un site unique XhoI du coté 5'. En Western immunoblotting la sous-unité recombinante exprimée par les bactéries hébergeant

pGC326 + pDSPH524 est fortement reconnue par les anticorps polyclonaux anti-CS31A et par l'anticorps monoclonal anti-épitope C du GET. La sous-unité hybride codée par pGC326 a un poids moléculaire plus élevé que la sous-unité sauvage en raison de l'addition des douze acides aminés de l'épitope C.

b) Conclusions pour la région V3.

Les résultats obtenus concordent bien avec les études immunostructurales. Cette région apparaît comme très permissive : 5 épitopes différents ont été introduits dans 2 sites différents de la région V3, conduisant dans tous les cas à la production de CS31A, quoique de façon plus faible dans le mutant 8 pour les épitopes polio et FMDV et dans le mutant 9 pour l'épitope A du GET et l'épitope du rotavirus.

De plus cette région est située à l'extérieur de la molécule puisque les épitopes C du GET sont reconnus sur les bactéries recombinantes par les anticorps monoclonaux correspondants. Cette région très tolérante apparaît donc comme une région de choix pour l'insertion de polypeptides étrangers devant être présentés à l'extérieur de la molécule. L'introduction de séquences étrangères peut donc être réalisée soit par substitution, à partir des mutants 7, 8 et 9, soit par insertion additionnelle à partir du mutant 10.

3) Manipulation dans la région D.

A partir des mutants 7, 8 et 9 (figure 32) des substitutions ont été réalisées entre la région V3 (délimitée dans la figure 9 par les acides aminés situés aux positions 186 et 221) et l'acide aminé C-terminale (représenté dans la figure 9 par l'asparagine situé en position 257) de la sous unité ClpG.

a) Dans le mutant 7.

L'ADN correspondant au plasmide recombinant du mutant 7, qui contient un site unique SpeI dans la région V3 (figure 32) et un site unique XbaI dans le polylinker du vecteur pSelect1, a été restreint par SpeI et XbaI. Du fait de la compatibilité des extrémités générées par SpeI et XbaI, le plasmide ainsi restreint a pu être recircularisé par la T4 DNA ligase pour donner le plasmide pDSX28. Cette opération a permis d'éliminer les 59 derniers acides aminés C-terminaux de la sous-unité ClpG situés dans la figure 9 entre les acides aminés aux positions 198 et 257, et de fusionner à la protéine ClpG une séquence étrangère de 100 acides aminés codés par une partie de l'ADN du vecteur en phase avec le reste du gène clpG non modifié.

Les résultats obtenus en Western immunoblotting avec les anticorps polyclonaux anti-CS31A indiquent que les bactéries hébergeant les plasmides pDSPH524 + pDSX28 expriment toujours, bien que faiblement, la capsule CS31A.

b) Dans le mutant 8.

L'ADN correspondant au plasmide recombinant du mutant 8, qui contient un site unique HpaI dans la région V3 (figure 32) et un site unique SmaI dans le polylinker du vecteur pSelect1, a été restreint par HpaI et SmaI. En raison des extrémités franches générées par HpaI et SmaI, le plasmide ainsi restreint a pu être recircularisé par la T4 DNA ligase pour donner le plasmide pDHS68. Cette manipulation a abouti à l'élimination des 67 derniers acides aminés C-terminaux de la sous-unité ClpG situés dans la figure 9 entre les acides aminés aux positions 199 et 257, et à l'introduction par fusion génétique d'une séquence étrangère de 84 acides aminés codés par une partie de

l'ADN du vecteur en phase avec le reste du gène clpG non modifié.

5 Les résultats obtenus en Western immunoblotting avec les anticorps polyclonaux anti-CS31A indiquent que les bactéries hébergeant les plasmides pDSPH524 + pDHS68 expriment toujours, bien que faiblement, le CS31A.

c) Dans le mutant 9.

10 L'ADN correspondant au plasmide recombinant du mutant 9, qui contient un site unique BglIII dans la région V3 (figure 32) et un site unique BamHI dans le polylinker du vecteur pSelect, a été restreint par BglIII et BamHI. En raison de la compatibilité des extrémités
15 cohésives générées par BglIII et BamHI, le plasmide ainsi restreint a pu être recircularisé par la T4 DNA ligase pour donner le plasmide pDBB10. Cette recircularisation a eu pour effet d'éliminer les 41 derniers acides aminés C-terminaux de la sous-unité ClpG situés dans la figure
20 9 entre les acides aminés aux positions 216 et 257, et d'introduire par fusion génétique une séquence étrangère de 84 acides aminés codés par une partie de l'ADN du vecteur en phase avec le reste du gène clpG non modifié.

25 Les résultats obtenus en Western immunoblotting avec les anticorps polyclonaux anti-CS31A indiquent une très bonne réactivité des bactéries hébergeant les plasmides pDSPH524 + pDBB10.

30 II - Après mutagenèse insertionnelle au hasard.

1) Principe.

Le procédé de mutagenèse insertionnelle au hasard qui a permis de détecter les régions permissives
35 dans la protéine ClpG, a été mis à profit pour

l'insertion de l'épitope C du virus de la gastroentérite transmissible (GET) du porc. Cet épitope continu est un site antigénique majeur de la glycoprotéine externe E2 qui est le meilleur candidat comme antigène protecteur

5

potentiel, puisqu'il est capable d'induire des anticorps neutralisants et de stimuler l'immunité à médiation cellulaire.

Un oligonucléotide de synthèse correspondant à la séquence nucléotidique codant pour l'épitope C est inséré dans le site EcoRI qui a été préalablement placé dans les sites permissifs du gène clpG par insertion au hasard d'un linker EcoRI. Les clones mutés dans le gène clpG ayant incorporé l'oligonucléotide sont analysés par immunoblotting à l'aide d'un anticorps polyclonal spécifique de la protéine ClpG et d'un anticorps monoclonal spécifique de l'épitope C du coronavirus GET.

10

15

2) Méthode.

20

a) Insertion de l'épitope C du virus GET.

Un oligonucléotide double brin non phosphorylé codant pour l'épitope C du GET (acides aminés 361-372), de séquence : SDSSFFSYGEIP, et comportant un site EcoRI aux extrémités 5' et 3', a été synthétisé. Cet oligonucléotide contient un site de restriction BspEI (BspMII, AccIII, Kpn 21, MroI) (5'- TCC GGA-3') qui facilite la sélection des recombinants possédant l'épitope C.

25

Les séquences oligonucléotidique et peptidique correspondant à l'épitope C introduit dans le linker EcoRI sont indiquées figure 36.

30

Le choix des codons est basé sur la fréquence des codons préférentiellement utilisés dans le gène clpG. L'oligonucléotide double brin non-phosphorylé en 5' a été mis en présence de la T4 DNA ligase et d'un

35

mélange d'ADN de pDEV41155 préalablement linéarisé par EcoRI dont le site est présent dans différentes régions permissives du gène *clpG*. Après transformation des *E.coli* DH5 α , le mélange de transformation a été mis
5 directement en culture dans du LB liquide avec de l'ampicilline. L'ADN plasmidique total extrait à partir de cette culture a été restreint par BspEI. Un mélange d'ADN linéaire est récupéré et purifié à partir d'un gel d'agarose. Cette étape a permis d'isoler uniquement
10 l'ADN plasmidique ayant inséré l'oligonucléotide correspondant à l'épitope C. Cet ADN est recircularisé par ligation et transféré dans la souche *E.coli* DH5 α hébergeant le plasmide pDSPH524 afin de tester par complémentation intergénique la présence de l'épitope C
15 dans les polymères de surface CS31A.

b) Immunoréactivité des protéines hybrides ClpG-épitope C.

Au total 1000 clones ayant incorporé l'épitope C du GET ont été obtenus et analysés pour la
20 production des polymères de surface CS31A et pour l'antigénicité de l'épitope C. Les clones synthétisant la protéine CS31A à la surface des bactéries mutantes ont été détectés par un test d'immunodétection *in situ* sur colonies en utilisant un sérum anti-CS31A natif.
25 Ainsi, 492 clones mutants (49%) se sont révélés positifs pour la production de CS31A, suggérant que les protéines hybrides, ClpG-épitope C, sont intégrées dans la structure finale de CS31A. Pour examiner l'antigénicité de l'épitope C, ces 492 clones CS31A⁺ ont été testés par
30 immunoblotting *in situ* sur colonies avec les anticorps monoclonaux Mab 3b.5 spécifiques de l'épitope C du virus GET (Delmas, B. et al. 1990 J. Gen. Viro. 71: 1313).

La figure 37 indique l'immunoréactivité des protéines ClpG modifiées :
35

- En A : Immunoréactivité avec l'anticorps monoclonal Mab 3b.5 anti-épitope C du GET (Delmas, B. et al. 1990 J. Gen. Viro. 71: 1313) par immunoblotting *in situ* sur colonies.

5 - En B : Western blotting avec un sérum anti-ClpG (a) et avec l'anticorps monoclonal Mab 3b.5 (b) des protéines ClpG modifiées (canaux 1-4 et 6-10) et non modifiées (canal 5) en conditions dénaturantes.

10 La figure 37A montre que seulement 11 colonies (2 %) réagissent avec l'anticorps Mab 3b.5. L'immunoréactivité de ces protéines hybrides avec l'anticorps Mab 3b.5 et avec les anticorps polyclonaux anti-CS31A natif est confirmée par Western blotting en conditions dénaturantes (figure 37B) et non
15 dénaturantes. En conditions dénaturantes (SDS-PAGE, 100°C/ 5mn) tous les 11 clones (seulement 9 sont montrés dans la figure 37B) réagissent avec les deux types d'anticorps et présentent une plus faible migration électrophorétique que la protéine ClpG sauvage, due à la
20 présence des 16 acides aminés supplémentaires correspondant à l'épitope C. En conditions non dénaturantes (PAGE sans SDS et sans chauffage à 100°C pendant 5 mn) les profils électrophorétiques montrent une structure oligomérique des protéines ClpG hybrides,
25 semblable à la protéine ClpG sauvage.

c) Localisation de l'épitope C dans la protéine ClpG hybride.

30 La localisation de l'épitope C dans la protéine ClpG hybride est déterminée par séquençage. Les résultats indiquent que chez les 11 clones mutants l'épitope C est inséré exactement entre le peptide signal et le peptide mature de la pré-protéine ClpG.

35 La figure 38 représente la séquence de l'oligonucléotide codant pour l'épitope C du GET

introduit entre le peptide signal et la protéine mature de la préprotéine ClpG.

L'analyse par séquençage de l'ADN
plasmidique de quelques clones mutants exprimant le
5 CS31A mais pas l'épitope C du GET, indique que l'ADN
synthétique codant pour cet épitope a été inséré dans
une mauvaise orientation à l'intérieur même de la
séquence signal de clpG situé dans la figure 9 entre les
acides aminés aux positions -21 et + 1 de CS31A (figure
10 14). Quatre insertions de séquences hétérologues ont été
obtenues (les séquences hétérologues additionnelles sont
soulignées):

- La première entre les acides aminés situés aux positions -13 et -12 de la figure 9 :

15 -21 -13 -12
 MKKTLIALA GIPEFHHRKRKNYHOIPALA VAVSAV

- La deuxième entre les acides aminés situés aux positions -7 et +8 de la figure 9 :

20 -21 -7 +8
 MKKTLIALAVAVSAV PEERNFTIGKERTITEER GSFDM

- La troisième entre les acides aminés situés aux positions -6 et +1 de la figure 9 :

-21 -1 +1
MKKTLIALAVAVSAVSGAAHA EERNETIGKERTITEFRA W

25 - La quatrième entre les acides aminés
situés aux positions -6 et -1 de la figure 9 .:

-21 -6 -1
MKKTLIALAVAVSAVS RNSGISPOEKKELSLNSG AW

La phase de lecture ayant été respectée on comprend la raison pour laquelle la capsule CS31A, à l'inverse de l'épitope C, est toujours exprimée. Cela montre que la séquence signal de ClpG peut être une région permissive et qu'il peut exister plusieurs sites de coupure par la signal peptidase à l'intérieur de la séquence signal de ClpG.

Ce travail démontre qu'il est possible d'insérer un peptide hétérologue de 20 acides aminés aussi bien dans la préprotéine ClpG que dans la protéine mature sans perturber la biogénèse de CS31A et de telle manière qu'il soit antigénique chez la protéine native.

III - Insertion dirigée de l'épitope C du virus GET entre le peptide signal et le peptide mature de la pré-protéine ClpG.

Un oligonucléotide (42 mer) double brin non-phosphorylé codant pour l'épitope C de 9 acides aminés (SSFFSYGEI) et comportant le site SphI (5'-GCATGC-3') à chacune de ses extrémités a été synthétisé. Cet oligonucléotide contient les sites de restriction PstI, XhoI et NsiI. L'insertion de l'oligonucléotide de synthèse dans le site unique SphI du plasmide recombinant pDEV41155 (figure 12) est montrée par la figure 39. Le plasmide recombinant résultant de cette insertion est appelé pGISA. La figure 39 représente le schéma d'insertion de l'épitope C du GET entre le peptide signal et la protéine mature de la préprotéine ClpG. La séquence en caractère gras désigne la séquence de l'oligonucléotide de synthèse qui a été insérée dans le gène clpG. La séquence en acides aminés correspondant à l'épitope C du GET est encadrée. La séquence des 14 acides aminés marqués en caractères gras correspond au peptide qui a été ajouté dans la séquence peptidique de la protéine ClpG mature.

Le site SphI dans le gène clpG est localisé à 7 pb en amont du codon TGG qui correspond au premier acide aminé (Tryptophane :W) de la protéine ClpG mature. Le site de coupure initial (AHA/WT) de la signal peptidase a été modifié et optimisé (AHA/AD). Le résultat final de l'insertion conduit à l'addition de 14 acides aminés (ADSSFFSYGEIMHA) dans la séquence

peptidique de la protéine ClpG mature entre la position -1 et +1 de la séquence peptidique initiale.

5 Après clonage de l'oligonucléotide de
synthèse dans le site SphI du gène clpG et transformation
de la souche E.coli DH5 α , les clones hybrides ont été
testés par immunoblotting avec un sérum anti-CS31A natif
et l'anticorps monoclonal Mab 3b.5 spécifique de
l'épitope C.

10 Deux techniques immunologiques ont été
utilisées : l'immunodétection *in situ* des protéines
hybrides natives sur colonies et l'immunodétection des
protéines hybrides dénaturées sur Western blots.

15 Dans les deux cas, les résultats indiquent
une immunoréactivité des protéines hybrides, ClpG-
épitope C, avec les deux types d'anticorps. Ceci
démontre que les protéines ClpG hybrides sont
normalement exportées et polymérisées pour constituer le
CS31A et que l'épitope C est exposé à la surface de
celui-ci.

20 IV - Coinsertion d'épitopes viraux dans la
protéine ClpG.

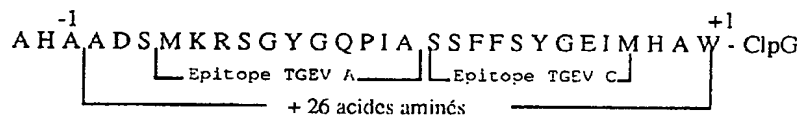
25 1) Coinsertion des épitopes A et C du virus
GET.

a) Entre le peptide signal et le peptide
mature de la pré-protéine ClpG.

a.1) Un oligonucléotide (36 mer) double brin
non phosphorylé de séquence :

30 (5' - TCG ATG AAG AGA TCT GGC TAT GGT CAG CCT ATT GCG - 3'
3' - AC TTC TCT AGA CCG ATA CCA GTC GGA TAA CGC AGC T - 5')
codant pour l'épitope A de 12 acides aminés
(SMKRSGYGQPIA) et comportant un site compatible avec
XhoI (5'-CTC GAG-3') à chacune de ses extrémités a été
35 synthétisé. Cet oligonucléotide qui contient le site de

restriction BglII (5'-AGA TCT-3') a été inséré dans le site unique XhoI du plasmide recombinant pGISA (Chapitre H paragraphe III et figure 39). Le site XhoI est situé immédiatement en amont de la séquence codant pour l'épitope TGEV C. Ainsi la coininsertion des épitopes A et C du virus GET entre le peptide signal et le peptide mature de la pré-protéine ClpG correspond finalement à une séquence hétérologue additionnelle de 26 acides aminés par rapport à la protéine ClpG originelle :



L'ensemble du gène clpG modifié comportant à la fois la séquence codant pour l'épitope A et celle codant pour l'épitope C du virus GET a été remplacé par clonage moléculaire dans son opéron d'origine qui avait été préalablement cloné dans le plasmide pHSG575 (Martin C. et al., 1991). La construction finale a conduit à l'obtention du plasmide pGAC524. L'immunodétection *in situ* des protéines modifiées natives sur colonies et l'immunodétection des protéines hybrides dénaturées sur Western blots avec un sérum anti-CS31A natif (figure 40) et des anticorps monoclonaux anti-sites C et A du GET a démontré que les protéines trihybrides, épitope TGEV A-épitope TGEV C-ClpG, étaient encore immunoréactives. Ceci indique que la protéine ClpG trihybride était exprimée, exportée et polymérisée pour constituer la capsule CS31A.

a.2) Une autre construction analogue à celle-ci a été réalisée, mais différente quant à l'agencement des épitopes A et C du virus GET en amont du gène clpG. Dans ce cas l'épitope A a été inséré non pas avant le site C, mais après celui-ci entre le

peptide signal et le peptide mature de la pré-protéine ClpG :

Un oligonucléotide (36 mer) double brin non phosphorylé de séquence :

5 (5' - G AAA AGA TCT GGT TAT GGA CAG CCG ATT GCA GTG CA - 3'
3' - AC GTC TTT TCT AGA CCA ATA CCT GTC GGC TAA CGT C - 5')
codant pour l'épitope A de 12 acides aminés
(KRSYGQPIAVH) et comportant un site compatible avec le
site NsiI (5'-ATG CAT-3') à chacune de ses extrémités à
10 été synthétisé. Cet oligonucléotide contenant le site
BglII (5'-AGA TCT-3') a été inséré dans le site unique
NsiI du plasmide recombinant pGISA (Chapitre H
paragraphe III et figure 39). Le site NsiI est situé
immédiatement en aval de la séquence codant pour
15 l'épitope TGEV C. La coinsertion des épitopes A et C du
virus GET entre le peptide signal et le peptide mature
de la pré-protéine ClpG correspond à une séquence
hétérologue additionnelle de 26 acides aminés par
rapport à la protéine ClpG originelle :

20
A H A A D S S F F S Y G E I M Q K R S G Y G Q P I A V H A W-ClpG
Epitope TGEV C Epitope TGEV A
+ 26 acides aminés

La construction finale a conduit à
l'obtention du plasmide pGCA41155. L'immunodétection des
protéines hybrides dénaturées sur Western blots avec un
25 sérum anti-CS3IA natif (figure 40) et des anticorps
monoclonaux anti-sites C et A du GET a démontré que les
protéines trihybrides, épitope TGEV C-épitope TGEV A-
ClpG, étaient très immunoréactives. Ceci indique que la
protéine ClpG trihybride était exprimée, exportée et
30 polymérisée pour former le CS3lA. Cependant le niveau
d'expression de ClpG évalué par Western blot avec ces
trois types d'anticorps semble plus faible dans le cas
du trihybride, NH2-épitope TGEV A-épitope TGEV C-ClpG-

COOH, comparativement au trihybride NH₂-épitope TGEV C-épitope TGEV A-ClpG-COOH.

Cette différence peut provenir du type d'agencement des épitopes A et C dans la protéine ClpG qui conduit à une conformation plus ou moins contraignante de l'ensemble de la séquence hétérologue susceptible d'affecter une des étapes impliquées dans la biogénèse de CS31A. Elle peut aussi découler du système de complémentation utilisé pour l'étude de l'expression de CS31A dans chacune de ces constructions (Trans ou Cis complémentation).

b) Dans la région V3.

b.1) Un oligonucléotide de 36 mer double brin non phosphorylé de séquence :

(5' - CTA GCG ACT CGA GCT TCT TTT CGT ACG GTG AGA TTC - 3'
3' - GC TGA GCT CGA AGA AAA GCA TGC CAC TCT AAG GAT C - 5')

codant pour l'épitope C de 12 acides aminés (SDSSFFSYGEIP) et comportant un site compatible avec le site SpeI (5'-ACT AGT-3') a été synthétisé. Cet oligonucléotide qui contient les sites de restriction XhoI (5'-CTC GAG-3') et SplI (5'-CGT ACG-3') a été inséré dans le site unique SpeI du plasmide pGA102 (Figure 34) comportant la séquence codant pour l'épitope A du virus GET (Figure 27). Dans la construction finale l'épitope TGEV C a donc été placé immédiatement en amont de l'épitope TGEV A. Le plasmide résultant de la coininsertion de ces deux épitope est le pGCA 102 :

NH₂-ClpG-NKTSSDSSFFSYGEIPSMKRSGYGQPIAGDL-ClpG-COOH

Epitope Epitope
TGEV C TGEV A

Les protéines ClpG hybrides ont été testées par immunoblotting avec un sérum anti-CS31A natif (figure 40), un anticorps monoclonal anti-site A du GET et l'anticorps Mab 3b5 spécifique de l'épitope C. Deux

techniques immunologiques ont été utilisées, l'immunodétection *in situ* des protéines hybrides natives sur colonies, et l'immunodétection des protéines hybrides dénaturées sur Western blots (Figure 40).

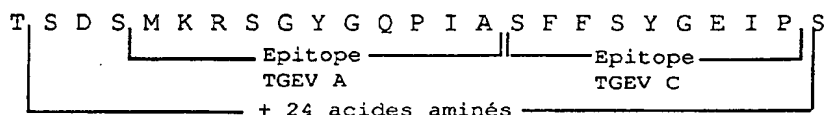
5 Les résultats indiquent une très bonne immunoréactivité du trihybride NH₂-ClpG-épitope TGEV C-épitope TGEV A-ClpG-COOH, avec les trois anticorps.

Cependant, les résultats obtenus sur Western blots avec des anticorps polyclonaux anti-CS31A
10 indiquent qu'une sous-population de ce trihybride est tronquée au niveau de l'épitope TGEV A. En effet, deux bandes ont été visualisées sur Western blots; une bande supérieure dominante correspondant au trihybride complet et une bande inférieure faible correspondant seulement à
15 la partie protéique de ClpG située en amont de l'épitope TGEV A.

b.2) Un oligonucléotide (36mer) double brin non phosphorylé de séquence :

(5' - TCG ATG AAG AGA TCT GGC TAT GGT CAG CCT ATT GCG - 3'

20 3' - AC TTC TCT AGA CCG ATA CCA GTC GGA TA CGC AGC T - 5')
codant pour l'épitope A du GET de 12 acides aminés (SMKRSGYGQPIA) et comportant un site compatible avec XhoI (5'-CTC GAG- 3') à chacune de ses extrémités a été synthétisé. Cet oligonucléotide qui contient le site
25 unique BglII (5'-AGA TCT- 3') a été inséré dans le site unique XhoI du plasmide recombinant pGC326, situé en amont de la séquence codant pour l'épitope TGEV C (chapitre H, paragraphe I). La coinsertion des épitopes A et C du GET correspond à une séquence hétérologue
30 additionnelle de 24 acides aminés par rapport à la protéine ClpG originelle :



La construction finale a conduit à l'obtention du plasmide pGAC326. L'immunodétection des protéines trihybrides dénaturées sur Western blots avec un sérum anti-CS31A natif et des anticorps anti-TGEV A et anti-TGEV C montre que le CS31A est exprimé par les bactéries hébergeant les plasmides pDSPH524 + pGAC326. Cependant, une large population de protéines trihybrides semble être tronquée au niveau de l'épitope A. Trois bandes ont été visualisées sur Western blots avec le polyclonal anti-CS31A; une bande supérieure mineure correspondant au trihybride complet, une large bande intermédiaire correspondant à la partie protéique située en amont de l'épitope TGEV A et une bande inférieure faible correspondant à la partie protéique de ClpG située en aval de l'épitope TGEV A.

2) Coinsertion de l'épitope TGEV C et de l'épitope C3 du VP1 du virus de la polio type 1.

A partir du plasmide pGISA (figure 39) et pP101 figure 34) les séquences nucléotidiques codant pour l'épitope TGEV C et l'épitope C3 de VP1 ont été simultanément remplacées par clonage moléculaire dans l'opéron CS31A qui avait été préalablement cloné dans le plasmide pHSG575 (Martin et al., 1991). La construction finale conduit à l'obtention du plasmide pPOGI1011. Dans cette construction l'épitope TGEV C est situé entre le peptide signal et le peptide mature de ClpG entre les acides aminés -1 et +1 des figures 9 et 32, et l'épitope C3 du VP1 dans la région V3 du ClpG entre les acides aminés situés dans les figures 9 et 39 aux positions 202 et 215. L'étude de l'expression de la protéine ClpG

comportant à la fois l'épitope TGEV C et l'épitope C3 du VP1 a montré que la biogénèse de CS31A était détectable mais faible. En effet, les résultats obtenus en Western immunoblotting avec un sérum anti-CS31A natif (Figure 40) et avec l'anticorps monoclonal Mab 3b.5 spécifique de l'épitope TGEV C indiquent une baisse du niveau d'expression du ClpG par rapport à la protéine homologue non modifiée.

3) Coinsertion des épitopes A et C du TGEV et de l'épitope C3 du VP1 de la polio type 1.

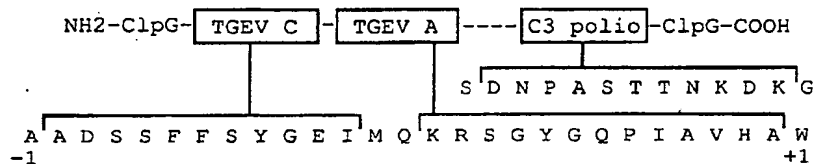
Un oligonucléotide (36 mer) double brin non phosphorylé de séquence :

(5' - G AAA AGA TCT GGT TAT GGA CAG CCG ATT GCA GTG CA - 3'
3' - AC GTC TTT TCT AGA CCA ATA CCT GTC GTC GGC TAA CGT C - 5')

codant pour l'épitope A de 12 acides aminés (KRSGYGQPIAVH) et comportant un site compatible avec le site NsiI (5'-ATG CAT-3') à chacune de ces extrémités a été synthétisé.

Cet oligonucléotide qui contient le site BglIII (5'-AGA TCT-3') a été inséré dans le site unique NsiI du plasmide recombinant pPOGI1011 (chapitre H, paragraphe IV). Ce plasmide contient la séquence nucléotidique codant pour l'épitope C3 du VP1 situé dans la région V3 de ClpG (entre les acides aminés situés aux positions 202 et 215 des figures 9 et 32) et celle codant pour l'épitope TGEV C situé entre le peptide signal et le peptide mature du ClpG (entre les acides aminés situés aux positions -1 et +1 des figures 9 et 32). Le site NsiI est situé immédiatement en aval de la séquence codant pour l'épitope TGEV C. Le plasmide résultant de cette construction est le pPOGCA 101. Ainsi la coinserterion des épitopes TGEV C, TGEV A et de l'épitope C3-polio dans ClpG correspond à une séquence

hétérologue additionnelle de 26 acides aminés par rapport à la protéine ClpG originelle :



5 Les résultats obtenus en Western immunoblotting avec un sérum anti-CS31A natif (figure 40) et avec les anticorps monoclonaux anti-sites A ou C du GET indiquent une baisse importante du niveau d'expression du tétrahybride, NH2-ClpG-TGEV C-TGEV A-
10 C3 polio-ClpG, par rapport à la protéine ClpG non modifiée et même par rapport à l'ensemble des trihybrides obtenus.

15 I) CONCLUSION CONCERNANT L'INSERTION D'EPITOPES VIRAUX DANS LA PROTEINE CLPG.

20 Parmi les 4 régions A, B, C et D permissives pour les insertions ou substitutions hétérologues, le clonage d'ADN synthétiques correspondant à différents épitopes viraux a été réalisé dans les régions A, C et D.

1) Dans la région A.

25 Des constructions par insertion ont été obtenues selon deux stratégies différentes (insertions après mutagenèse au hasard ou insertions dirigées par clonage direct). Dans les deux cas la séquence correspondant à l'épitope C du virus GET a été clonée en position N-terminale entre le peptide signal et la peptide mature de la pré-protéine ClpG (entre les acides
30 aminés situés dans la figure 9 aux positions -1 et +1). Dans les deux cas, la protéine hybride, ClpG-épitope C

du virus GET, est produite en quantité importante et l'épitope est reconnu par l'anticorps monoclonal chez la protéine hybride sous sa forme native.

5 Dans quelques cas, des séquences peptidiques hétérologues de 5 à 20 acides aminés ont été introduites par insertion ou substitution après mutagenèse au hasard dans la préprotéine ClpG entre les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions -13 et +8 sans perturber la biogénèse de CS31A.

10

2) Dans la région C.

Cinq constructions différentes comportant la séquence correspondant à l'épitope C du virus GET (pGC32, pGC19, pGC1, pGC4 et pGC44) et une sixième construction (pF1) codant pour un épitope de la protéine VP1 du virus de la fièvre aphteuse, ont été obtenues par insertion ou substitution. Dans tous les cas, la biogénèse de la protéine capsulaire hybride CS31A-épitope est affectée, les sous-unités protéiques n'étant plus exportées et polymérisées à la surface de la bactérie.

20

3) Dans la région D.

Dans cette région ont été obtenues :

25

a) Par substitution.

- Trois constructions comportant la séquence correspondant à l'épitope C du virus GET (pGG103, pGP105, pGP684), 2 constructions avec la séquence codant pour l'épitope C3 du virus polio (pP101 et pP688), une construction avec la séquence de l'épitope A du GET (pGA102) et une avec la séquence de l'épitope du rotavirus bovin (pR104), et enfin une construction avec la séquence correspondant à un épitope de VP1 du virus de la fièvre aphteuse (pF681). Les plasmides pGG103, pGP105 et pGP684 permettent d'obtenir une bonne

30

35

expression des protéines hybrides, CS31A-épitope C du GET, à la surface de la bactérie. Avec les 3 plasmides l'épitope C du virus GET est reconnu par l'anticorps monoclonal dans la protéine hybride sous sa forme native. Avec les constructions codant pour les protéines hybrides CS31A-épitope C3 du virus polio, le plasmide pP101 permet une bonne expression de la protéine hybride mais elle est faible avec pP688. Avec la construction codant pour un épitope de VP1 du virus de la fièvre aphteuse (pF681), l'expression de la protéine hybride est faible. Elle est proche de celle du témoin avec celles codant pour l'épitope A du GET (pGA102) ou l'épitope du rotavirus bovin (pR104).

- Trois constructions comportant une séquence hétérologue de 41 acides aminés (plasmide pDBB10), de 84 acides aminés (plasmide pDHS68) et de 100 acides aminés (plasmide pDSX68). Ces trois différentes séquences hétérologues ont été insérées dans la partie -COOH terminale de la protéine ClpG par substitution d'un fragment peptidique délimité dans la figure 9 par les acides aminés situés aux positions 190 et 257, et plus précisément :

. entre les acides aminés situés aux positions 216 et 257 pour pDBB10,

. entre les acides aminés situés aux positions 190 et 257 pour pDHS68,

. entre les acides aminés situés aux positions 198 et 257 pour pDSX68.

Parmi ces 3 constructions n'abolissant pas la biogénèse de CS31A, celle correspondant au plasmide pDBB10 permet une meilleure expression de ClpG.

b) Par insertion.

Une construction comportant la séquence correspondant à l'épitope C du virus GET (plasmide

5 pGC326) entre les acides aminés de ClpG situés dans la figure 9 aux positions 203 et 204. La protéine hybride ClpG-épitope C, qui est fortement reconnue par les anticorps polyclonaux anti-CS31A et l'anticorps monoclonal Mab 3b.5 anti-épitope C, est largement exprimée à la surface des bactéries hébergeant les plasmides pDSPH524 et pGC326.

10 Enfin plusieurs séquences hétérologues correspondant soit à deux épitopes différents d'un même virus (épitope TGEV A et TGEV C), soit à deux épitopes différents d'un même virus (TGEV A + TGEV C) plus un épitope d'un autre virus (épitope C3 de VP1 du virus polio type 1) ont été coinsérées avec succès dans la même protéine ClpG sans perturber la biogénèse de CS31A.

15 Les trihybrides, TGEV A-TGEV C-ClpG, ont été obtenus en coinsérant les épitopes TGEV A et TGEV C soit en position N-terminale (région A), soit dans la région V3 de ClpG (région D). Un tetrapeptide, TGEV A-TGEV C-C3 polio-ClpG, a été obtenu en coinsérant les épitopes TGEV A et TGEV C en position N-terminale et l'épitope C3 polio dans la région V3. Toutes les protéines trihybrides sont reconnues à la fois par les anticorps monoclonaux anti-TGEV A et anti-TGEV C et par l'anticorps polyclonal anti-ClpG. Par contre le

20 tetrahybride est reconnu fortement par l'anticorps polyclonal anti-ClpG, faiblement par l'anticorps monoclonal anti-TGEV C mais pas par l'anticorps anti-TGEV A.

25

J) IMMUNOGENICITE DES PROTEINES HYBRIDES
MESUREE PAR LA PRODUCTION D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA
PROTEINE CS31A ET LES PEPTIDES C OU A DU VIRUS GET OU
LES PARTICULES VIRALES. ACTIVITE SERONEUTRALISANT DES
SERUMS.

Des lots de cinq souris Swiss de lignées OF1 non consanguines ont été immunisées avec des bactéries recombinantes purifiées sous leur forme native ou dénaturée.

I - Protocoles d'immunisation et mesure de l'activité des anticorps sériques.

1) Inoculation intrapéritonéale de bactéries recombinantes.

J0 : 6×10^8 bactéries dans 0,3 ml d'un mélange à parties égales d'eau physiologique (phy) et d'adjuvant incomplet de Freund (AIF) : lot A.

J22 : 2×10^8 bactéries dans 0,1 ml du mélange phy/AIF.

J36 : 2×10^8 bactéries dans 0,1 ml du mélange phy/AIF.

Ce même protocole d'immunisation a été également utilisé en inoculant 0,3 ml de bactéries sans AIF : lot B.

2) Inoculation intrapéritonéale de protéines recombinantes purifiées.

a) Sous forme dénaturée : lot C. Les protéines en solution aqueuse sont inoculées par voie intrapéritonéale sous un volume de 0,3 ml contenant pour moitié de l'adjuvant incomplet de Freund.

J0 : 20 μ g de protéines.

J22 : 20 μ g de protéines.

J36 : 20 µg de protéines.

5 b) Sous forme native : lot D. Le protocole est identique mais la protéine sous forme native en solution aqueuse est associée à un gel d'hydroxyde d'alumine. La concentration finale d' $\text{Al}(\text{OH})_3$ est de 30 % et les souris reçoivent 0,3 ml par voie intrapéritonéale.

10 L'effet mémoire des hyperimmunisations réalisées avec les bactéries entières ou les protéines purifiées a été mesuré après un rappel effectué à environ J150 sous forme d'une inoculation intrapéritonéale de bactéries recombinantes (0,2 ml contenant 4×10^8 bactéries dans le mélange au demi phy/AIF) pour les lots A et B, de protéines
15 recombinantes (7 µg de protéines dans 0,1 ml d'un mélange au demi eau/AIF dans le cas des protéines sous forme dénaturée pour le lot C, ou d'une suspension aqueuse contenant environ 10^8 PFU/ml du virus GET souche
20 Purdue dans 0,3 ml, pour les souris du lot D ayant été immunisées avec la protéine recombinante sous forme native.

3) Mesure des titres anticorps.

25 Pour chaque souris du sang a été prélevé à J0, J21, J35 et J150 ainsi que 10 jours après le deuxième rappel soit à J45 (après l'hyperimmunisation) et 6 jours après le rappel à J150 pour mesurer l'effet mémoire.

30 Les IgG dirigées contre la protéine CS31A, les peptides C et A du virus GET et aussi contre les particules virales GET ont été mesurées par une technique ELISA indirecte. Dans les puits des plaques ELISA sensibilisés avec la protéine CS31A purifiée, on distribue des dilutions au demi du sérum des souris.

Après incubation puis lavage, on fait réagir des anti-IgG de souris marquées à la peroxydase. Après incubation et lavage, les IgG sont révélées par H₂O₂ en présence de 2-2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonic acide) dénommé ABTS. On lit l'intensité de la coloration à 405 nm. Le titre en anticorps est défini en considérant la dilution de sérum donnant une DO égale à 0,3.

Le titre des anticorps dirigés contre le peptide hétérologue introduit dans CS31A sont mesurés selon cette même méthode, mais en sensibilisant les plaques ELISA soit avec un peptide synthétique, soit avec les particules virales du GET. Les peptides synthétiques correspondant aux épitopes C et A du virus GET ont pour composition respective : TVSDSSFFSYGEIPF et SMKRSYGQPIAG.

4) Activité séroneutralisante des sérums.

L'activité séroneutralisante anti-virus GET a été mesurée selon la technique décrite par Laude et al. (1986, J. Gen. Microbiol., 67, 119-130). Des dilutions au demi ou au tiers de l'antisérum sont mélangées avec une suspension virale contenant 500 PFU de la souche TGEV Purdue-115. Après 1 heure d'incubation à 37° Celsius, 4 x 10⁴ cellules de la lignée ST sont ajoutées. Le titre de neutralisation est lu 40 heures plus tard. Un sérum de référence est inclus pour chaque expérimentation. Le titre est exprimé par l'inverse de la dilution de sérum protégeant le tapis cellulaire de l'effet cytopathogène du virus.

II - Résultats.

Les différentes constructions décrites précédemment correspondent pour la plupart à des séquences peptidiques virales qui ont été introduits

dans les zones permissives et naturellement immunogènes de la protéine CS31A.

5 A titre d'exemple, sont présentés aux figures 41 à 45 les titres et activités séroneutralisantes des anticorps sériques produits chez les souris immunisées avec les bactéries et protéines recombinantes obtenues avec le plasmides pGCA102. Avec ce plasmide, les épitopes C et A du virus GET sont produits dans la zone permissive V3 ou a été identifié
10 un épitope linéaire exposé à la surface de la protéine CS31A sous forme native.

La figure 41 représente les titres des anticorps produits par les souris immunisées avec la protéine recombinante GCA102 sous forme native associée
15 à de l'hydroxyde d'alumine, et reconnaissant respectivement :

- en (a), la protéine CS31A,
- en (b), le virus GET,
- en (c), le peptide A,
- 20 - en (d), le peptide C.

Dans cette figure "m" est la moyenne des log2 de l'inverse des dilutions d'anticorps donnant une DO > 0,3.

La figure 42 représente les titres des anticorps anti-peptide C produits par des souris immunisées avec la protéine recombinante GCA102 sous
25 forme native et ensuite avec le virus GET. Dans cette figure le trait en pointillé correspond aux souris témoins immunisées avec une protéine recombinante hétérologue puis avec le virus GET au 146ème jour.

La figure 43 représente les titres des anticorps produits par les souris immunisées avec la protéine recombinante GCA102 sous forme dénaturée (avec AIF), et reconnaissant respectivement :

- 35 - en (a), la protéine CS31A,

- en (b), le virus GET,
- en (c), le peptide A,
- en (d), le peptide C.

5 Dans cette figure "m" est la moyenne des \log_2 de l'inverse des dilutions d'anticorps donnant une $DO > 0,3$.

10 La figure 44 représente les titres des anticorps produits par les souris immunisées avec les bactéries produisant la protéine recombinante GCA102 (avec AIF), et reconnaissant respectivement :

- en (a), la protéine CS31A,
- en (b), le virus GET,
- en (c), le peptide A,
- en (d), le peptide C.

15 Dans cette figure "m" est la moyenne des \log_2 de l'inverse des dilutions d'anticorps donnant une $DO > 0,3$.

20 La figure 45 représente les titres des anticorps produits par les souris immunisées avec les bactéries produisant la protéine recombinante GCA102 (en solution saline), et reconnaissant respectivement :

- en (a), la protéine CS31A,
- en (b), le virus GET,
- en (c), le peptide A,
- en (d), le peptide C.

25 Dans cette figure "m" est la moyenne des \log_2 de l'inverse des dilutions d'anticorps donnant une $DO > 0,3$.

30 Les souris immunisées avec la protéine recombinante sous forme native associée à l'hydroxyde d'alumine produisent des anticorps reconnaissent les particules virales avec un titre élevé (figure 41. b) après la première phase d'hyperimmunisation (J45). Le deuxième rappel à J35 produit une légère augmentation de

la réponse anti-CS31A mais est sans effet sur le titre anti-virus GET.

Après un repos d'une centaine de jours les titres diminuent d'une façon considérable (50 fois par rapport à J45).

Après inoculation avec le virus GET (souche Purdue) les titres anti-virus GET remontent très rapidement (100 fois plus élevé après 6 jours), ce qui indique que la vaccination a induit un effet mémoire. Des résultats similaires, bien que de moindre intensité, sont observés en mesurant les titres des anticorps reconnaissant les peptides A (figure 41. c) et C (figure 41. d). Il s'agit bin là d'une réponse spécifique à l'encontre des séquences virales car le titre des anticorps anti-CS31A n'est pas modifié après inoculation du virus. On peut noter en outre que les titres des anticorps dirigés contre le peptide C sont toujours plus élevés que ceux des anticorps dirigés contre le peptide A.

Les résultats concernant les titres des anticorps dirigés contre le peptide C sont présentés sous une forme différente dans la figure 42; les titres des anticorps sont mesurés dans cette figure par la moyenne des mesures de la DO à 405 nm au lieu d'une moyenne des \log_2 de l'inverse de la dilution des sérums donnant une DO > 3 dans les figures 41, 43, 44 et 45. Avec cette représentation, les écarts types sont moins élevés mais les évolutions des courbes sont similaires.

Les résultats obtenus pour les souris immunisées avec la protéine recombinante GCA102 sous forme native sont sensiblement identiques à ceux observés chez les souris immunisées avec la protéine recombinante GCA102 sous forme dénaturée (figure 43). La principale différence est observée pour les titres des anticorps dirigés contre le peptide A (figure 43. c) qui

sont nettement plus élevés avec la protéine GCA102 sous forme dénaturée. Une stimulation des cellules à mémoire est très nettement observée lors du rappel à J150 avec la protéine recombinante dénaturée.

5 Des résultats comparables ont été obtenus chez les souris immunisées avec les bactéries recombinantes associées (figure 44) ou non (figure 45) à de l'adjuvant complet de Freund. Les titres sont cependant moins élevés que chez les souris immunisées avec les protéines purifiées.

10 Des résultats concernant l'activité séroneutralisante des sérums ont été obtenus par des mesures dans les sérums à J45 de 2 souris immunisées avec la protéine GCA102 sous forme dénaturée. Ces deux
15 sérums ont des titres anti-virus GET de 4000 et ils sont neutralisants au 1/150 pour l'un et au 1/500 pour l'autre vis à vis du virus GET.

20 III - Conclusions.

Les résultats rapportés ci-dessus démontrent que des séquences peptidiques virales introduites dans la région permissive et immunodominante V3 de la protéine CS31A permettent d'induire une bonne réponse
25 vaccinale anti-virus chez des animaux immunisés avec des bactéries ou des protéines recombinantes.

Un bon vaccin doit permettre une immunité de longue durée et une mémoire immunologique assurant une réponse immunitaire rapide protégeant lors d'un contact ultérieur avec l'agent infectieux ciblé par la
30 vaccination.

Les résultats expérimentaux obtenus sur la souris montre que la vaccination contre le virus GET, mesurée par les titres des anticorps dirigés contre le
35 virus entier ou les séquences peptidiques de la

glycoprotéine S (épitopes A et C), est caractérisée par une montée importante des anticorps au cours de la phase d'hyperimmunisation, puis une remontée très importante lorsque les souris reçoivent 100 jours plus tard un rappel par les protéines ou bactéries recombinantes ou le virus GET lui-même. Cet effet mémoire est caractéristique d'une bonne vaccination. L'activité séroneutralisante mesurée sur quelques sérums est aussi un résultat significatif. Il convient également de noter que la plupart des souris non-consanguines OF1 répondent à la vaccination? La séquence peptidique vaccinnante ne semble donc pas soumise à la restriction du CMH. Enfin, si les titre des anticorps les plus élevés sont obtenus en immunisant les souris avec les protéines recombinantes purifiées, les réponses obtenues avec les bactéries recombinantes apparaissent également très significatives.

Références.

- B. A. D. Stocker (1990). Res. Microbiol., 141, 787-796.
- 5 - P. Klemm, L. Hedegaard (1990). Res. Microbiol., 141, 1013-1017.
- De Graff F. K. (1988). J. of Microbiol., 54, 395-404.
- 10 - M. Hofnung (1988). J. of Microbiol., 54, 442-445.
- D. O'Callaghan, A. Charbit, P. Martineau, C. Leclerc, S. Van Der Werf, C. Nanciel, M. Hofnung (1990). Res. Microbiol., 141, 963-969.
- 15 - J. L. Harrison, I. M. Taylor, C. D. O'Connor (1990). Res. Microbiol., 141, 1009-1012.
- S. Pistor, G. Hobom (1990). Res. Microbiol., 141, 879-881..

REVENDEICATIONS

5 1) Sous-unité de la capsule protéique CS31A dont la séquence en acides aminés est modifiée par au moins un peptide hétérologue.

10 2) Sous-unité d'une capsule protéique CS31A selon la revendication 1, dont la séquence en acides aminés comprend au moins une insertion d'un peptide hétérologue et/ou au moins une substitution par un peptide hétérologue.

15 3) Sous-unité d'une capsule protéique CS31A selon l'une des revendication 1 et 2, caractérisée en ce que sa séquence en acides aminés est modifiée au niveau d'au moins une des régions suivante :

- 20 - région recouvrant le peptide signal et l'extrémité N-terminale de la protéine mature délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux position -13 et +8;
- région délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 10 et 58;
- région délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 123 et 164;
- 25 - région délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 183 et 257.

30 4) Sous-unité d'une capsule protéique CS31A selon la revendication 3, caractérisée en ce que sa séquence en acides aminés est modifiée entre les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions -1 et +1.

35 5) Sous-unité d'une capsule protéique CS31A selon la revendication 3, caractérisée en ce que sa séquence en acides aminés est modifiée au niveau de l'un

au moins des épitopes délimités dans la figure 9 par les acides aminés situés d'une part aux positions 10 et 19 et d'autre part 38 et 58.

5

6) Sous-unité d'une capsule protéique CS31A selon la revendication 3, caractérisée en ce que sa séquence en acides aminés est modifiée au niveau de l'épitope délimité dans la figure 9 par les acides aminés situés aux positions 151 et 160.

10

15

7) Sous-unité d'une capsule protéique CS31A selon la revendication 3, caractérisée en ce que sa séquence en acides aminés est modifiée au niveau de l'un au moins des épitopes délimités dans la figure 9 par les acides aminés situés aux positions 188 et 196, 211 et 219, 223 et 231 et 235 et 246.

20

8) Sous-unité d'une capsule protéique CS31A selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que sa séquence en acides aminés est modifiée par au moins un peptide hétérologue provenant de bactéries, de parasites ou de virus.

25

30

9) Sous-unité d'une capsule protéique CS31A selon la revendication 8, caractérisée en ce que sa séquence en acides aminés est modifiée par au moins un peptide hétérologue choisi parmi : l'épitope C ou l'épitope A du virus de la gastroentérite transmissible du porc, un épitope de la protéine VP6 du rotavirus bovin, l'épitope C3 du virus polio, un épitope de la protéine VP1 du virus de la fièvre aftéuse.

35

10) Procédé d'obtention d'une sous-unité d'une capsule protéique CS31A dont la séquence en acides aminés est modifiée par au moins un peptide hétérologue

selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'on introduit dans le gène codant pour la sous-unité au moins un fragment d'ADN codant pour un peptide hétérologue.

5

11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le fragment d'ADN codant pour un peptide hétérologue est introduit par clonage dans le gène codant pour la sous-unité après mutagénèse dirigée conduisant à la création de sites de restriction, par clonage dans des sites de restriction introduits par mutagénèse insertionnelle au hasard, ou par insertion dirigée d'un épitope hétérologue entre le peptide signal et le peptide mature de la pré-protéine de la sous-unité.

10

15

12) Procédé selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisé en ce que le fragment d'ADN codant pour un peptide hétérologue est introduit au niveau du segment du gène codant pour l'une des régions suivantes de la sous-unité :

20

- région recouvrant le peptide signal et l'extrémité N-terminale de la protéine mature délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions -13 et + 8;

25

- région délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 10 et 58;

- région délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 123 et 164;

30

- région délimitée par les acides aminés situés dans la figure 9 aux positions 183 et 257.

13) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le fragment d'ADN codant pour un peptide hétérologue est introduit au niveau du segment

35

du gène codant pour la région de la sous-unité délimitée dans la figure 9 par les acides aminés situés aux positions -1 et +1.

5

14) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le fragment d'ADN codant pour un peptide hétérologue est introduit au niveau du segment du gène codant pour l'une des régions de la sous-unité délimitées dans la figure 9 par les acides aminés situés aux positions 10 et 19 et 38 et 58.

10

15

15) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le fragment d'ADN codant pour un peptide hétérologue est introduit au niveau du segment du gène codant pour la région de la sous-unité délimitée dans la figure 9 par les acides aminés situés aux positions 151 et 160.

20

16) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le fragment d'ADN codant pour un peptide hétérologue est introduit au niveau du segment du gène codant pour la région de la sous-unité délimitée dans la figure 9 par les acides aminés situés aux positions 188 et 196, 211 et 219, 223 et 131 et 235 et 246.

25

17) Capsule protéique CS31A comportant une sous-unité selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

30

18) Micro-organisme ayant une membrane externe portant des capsules protéiques CS31A selon la revendication 17.

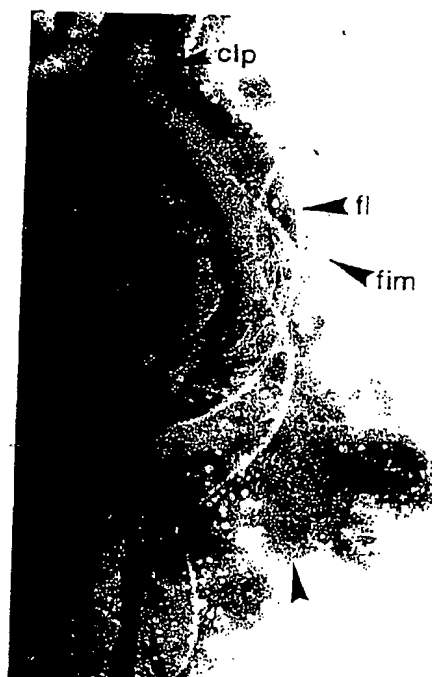
5 19) Composition a activité immunogène
comprenant en tant que principe actif au moins une sous-
unité d'une capsule protéique selon l'une des
revendications 1 à 9, ou une capsule protéique selon la
revendication 17, ou au moins un micro-organisme selon
la revendication 18.

10 20) Utilisation d'une composition immunogène
selon la revendication 19 pour la préparation de
vaccins.

 21) Utilisation d'une composition immunogène
selon la revendication 20 pour la préparation de tests
immunologiques.

1/52

Fig.1



1

Fig.2



2/52

Fig.3

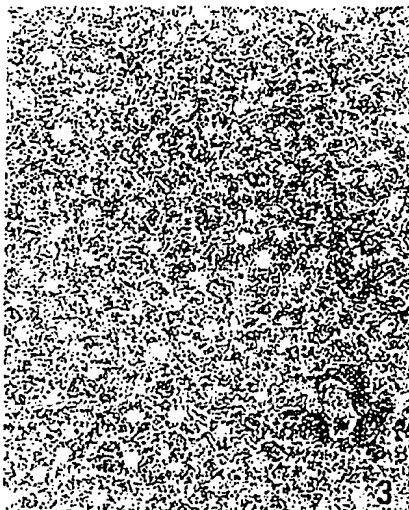


Fig.4

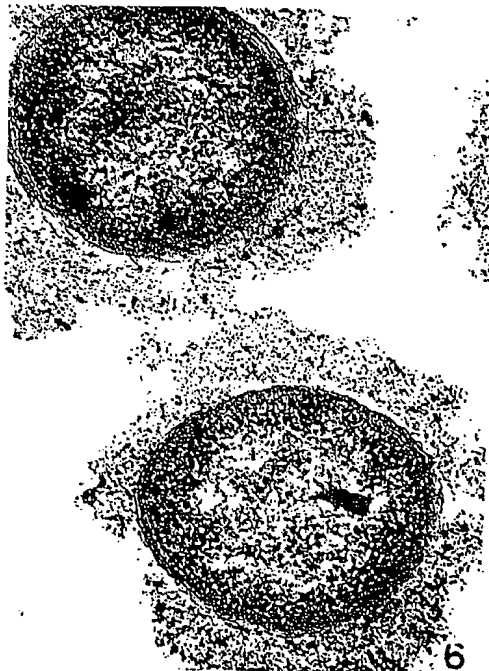


3/52

Fig. 5

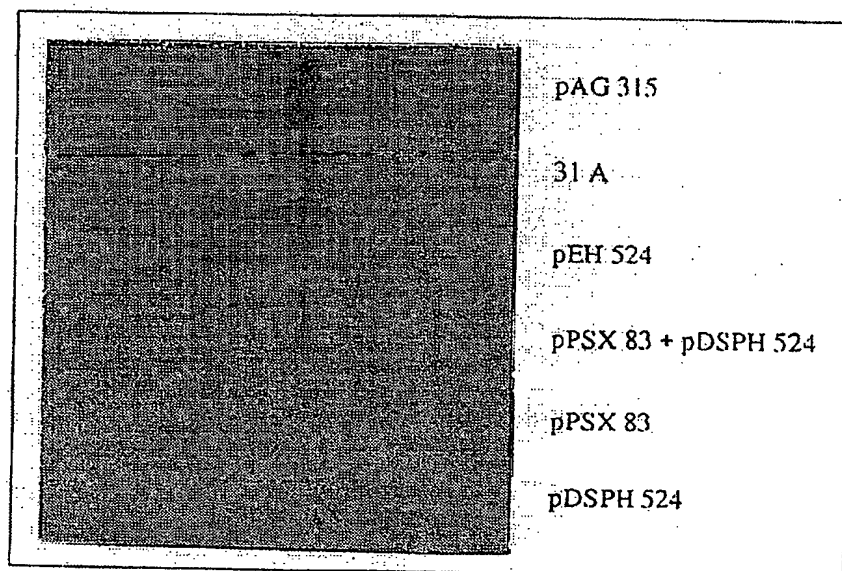


Fig. 6

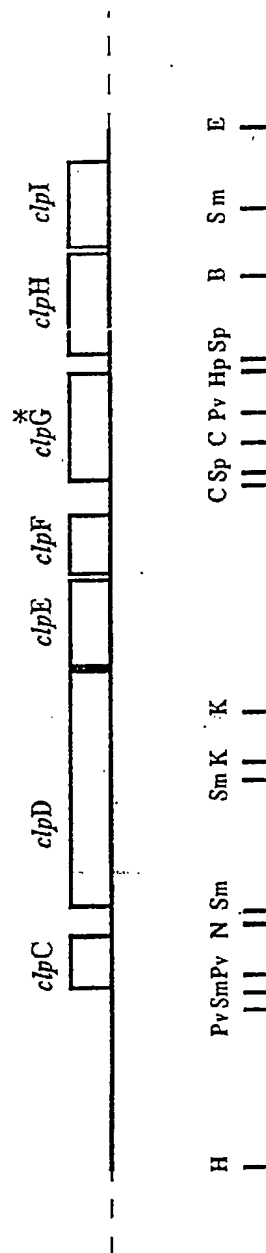


4/52

Fig. 7



5/52

Fig. 8

6/52

Fig.9a

ctcagtgccagacagcaggggtgagatgtggtga	33
taagcgtgccgaggcaaagaaacagggttgagttaa	68
gaacgatgcaccggcagagctgaagtcccggtca	102
gttaccggggaatcttgcagatagcactgcagggtg	137
gaagactgagaatttatctccgacaacagatgcaa	172
tacatccctgactccggaatgggtcatattggtaa	207
agggatttaccgtatttttaaaagggaataacgca	242
aaactattctgaattaaacactgtgtttaattaaa	277
gcggctattttaaataagtccacaggggatagttttg	313
cggtaattccggaaaaataaggattgccgatatcg	348
atattattattgtgaaatataaagggaatttatttt	383
ATG AAA AAG ACT CTG ATT GCA CTG GCT	390
M K K T L I A L A	9
GTG GCT GTT TCG GCA GTA TCA GGT GCG	408
V A V S A V S G A	18
GCG CAT GCG TGG ACC ACT GGT GAT TTT	426
A H A W T T G D F	27

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

7/52

Fig.9b

AAT	GGT	TCA	TTT	GAT	ATG	AAT	GGC	ACA	448
N	G	S	F	D	M	N	G	T	36
+1									
ATT	ACT	GCT	GAT	GCG	TAT	AAA	GAC	AAA	466
I	T	A	D	A	Y	K	D	K	45
TGG	GAA	TGG	ATG	GTT	GGG	GGC	GCT	CTC	484
W	E	W	M	V	G	G	A	L	54
TCC	TTC	AAC	AAC	ACT	ATC	AAG	GAA	ATG	502
S	F	N	N	T	I	K	E	M	63
ACA	GGT	GAC	AGT	AAG	CTG	CTG	ACC	ATC	520
T	G	D	S	K	L	L	T	I	72
ACT	CAG	TCT	GAA	CCA	GCT	CCT	ATT	CTT	538
T	Q	S	E	P	A	P	I	L	81
TTA	GGG	CGC	ACA	AAA	GAG	GCG	TTT	GCA	556
L	G	R	T	K	E	A	F	A	90
GCA	TCG	ATT	GTT	GGT	GTT	GGT	GCA	ATT	574
A	S	I	V	G	V	G	A	I	99
CCT	TTA	ATT	GCG	TTC	AGT	GAT	TAT	GAA	592
P	L	I	A	F	S	D	Y	E	108
GGG	AAC	GGA	GTT	GCC	TTA	CAG	AGT	TCT	601
G	N	G	V	A	L	Q	S	S	117
GGG	GAT	AAC	GGT	AAG	GGG	TTC	TTT	GAA	628
G	D	N	G	K	G	F	F	E	126

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

8/52

Fig.9c

TTG	CCC	ATG	AAA	GAT	GAT	AGT	GGA	AAT	646
L	P	M	K	D	D	S	G	N	135
AAT	CTC	GGT	AGC	GTA	AAA	GTT	AAT	GTT	664
N	L	G	S	V	K	V	N	V	144
ACT	TCT	GCT	GGC	CTG	TTT	TCC	TAT	AGT	682
T	S	A	G	L	F	S	Y	S	153
GAA	ATA	TCA	ACA	GGT	TTA	GTT	GGT	ATA	700
E	I	S	T	G	L	V	G	I	162
ACT	TCT	GTT	GCC	AGT	GGC	GAT	AAT	ACA	716
T	S	V	A	S	G	D	N	T	171
AGT	ATT	TAT	TAT	GGT	GGT	CTG	GTG	TCG	736
S	I	Y	Y	G	G	L	V	S	180
CCA	GCA	ATT	AGG	GCG	GGT	AAA	GAC	GCA	754
P	A	I	R	A	G	K	D	A	189
GCA	TCA	GCT	GTG	TCG	AAA	TTT	GGC	AAC	772
A	S	A	V	S	K	F	G	N	198
TAT	AAT	CAT	ACA	CAA	TTG	CTG	GGC	CAG	790
Y	N	H	T	Q	L	L	G	Q	207
CTT	CAA	GCA	GTA	AAC	CCT	AAC	GCG	GGC	808
L	Q	A	V	N	P	N	A	G	216
AAT	AGA	GGA	CAA	GTA	AAT	AAA	AAT	AGT	826
N	R	G	Q	V	N	K	N	S	225

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

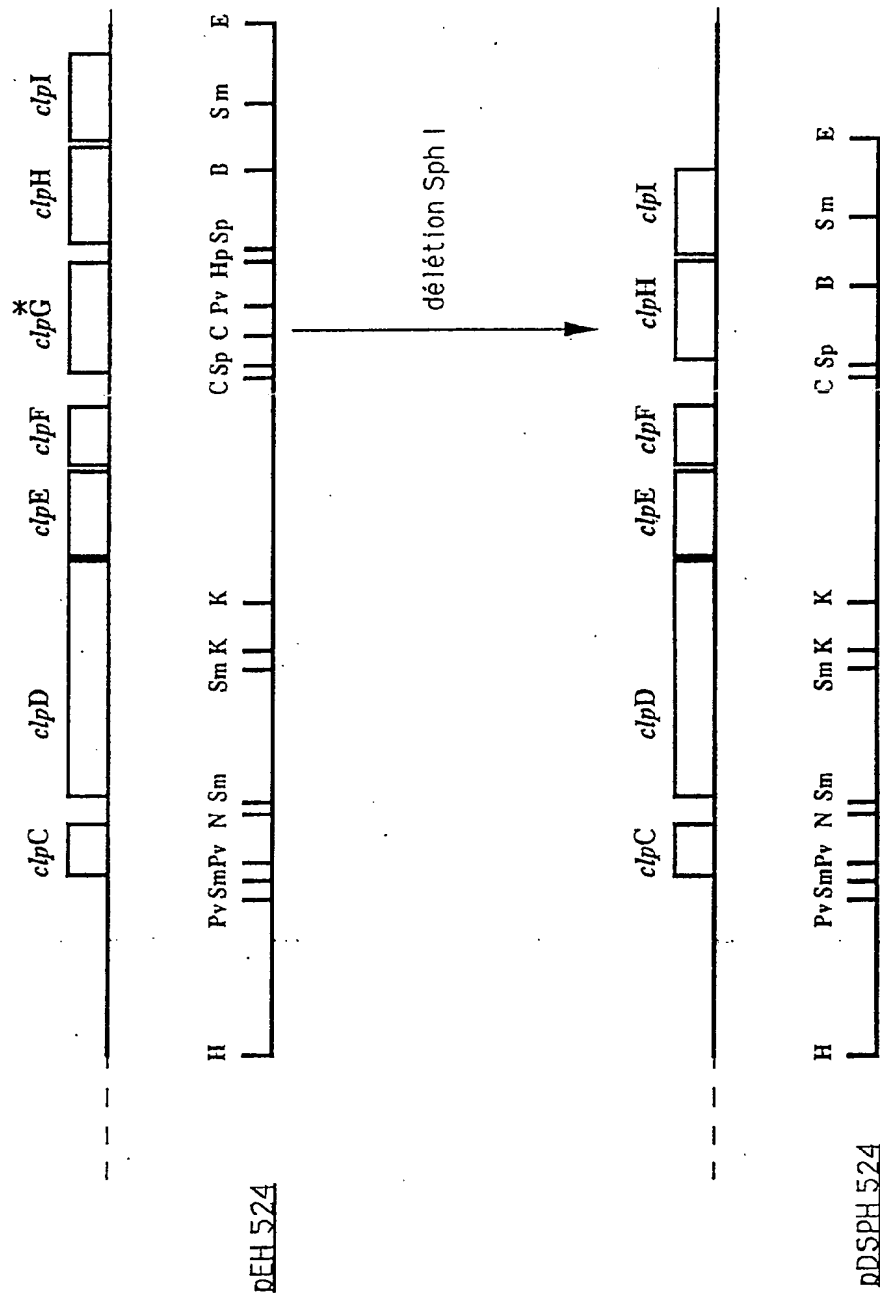
9/52

Fig.9d

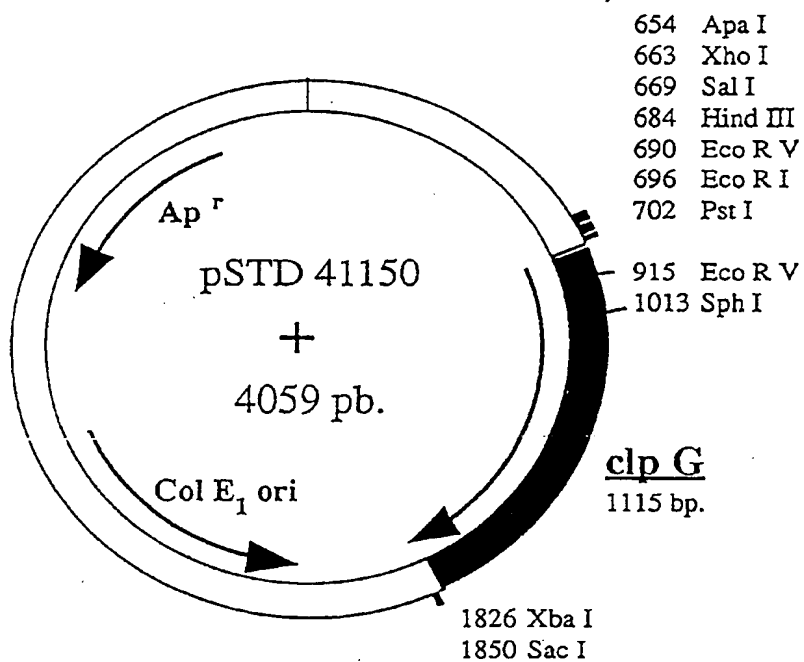
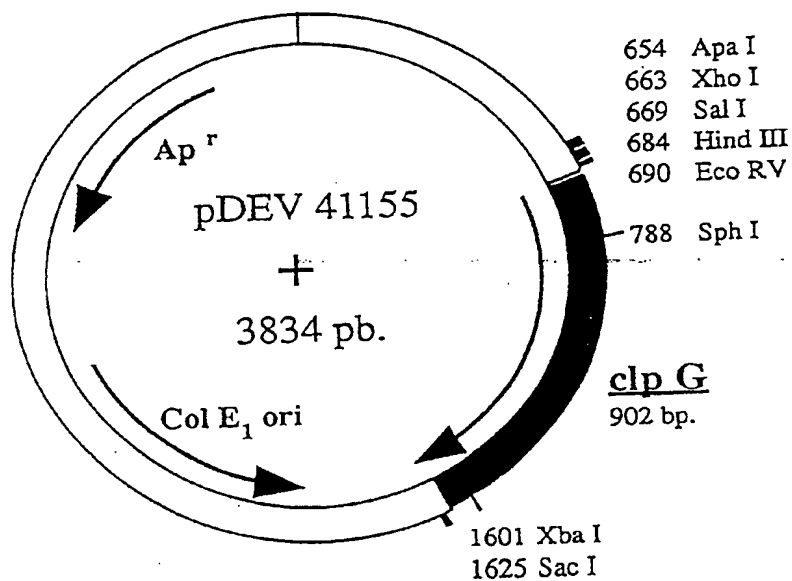
GCG	GTC	TCA	CAA	AAT	ATG	GTG	ATG	ACT	848
A	V	S	Q	N	M	V	M	T	234
ACT	GGT	GAT	GTA	ATT	GCA	TCC	TCT	TAC	862
T	G	D	V	I	A	S	S	Y	243
GCA	CTT	GGT	ATT	GAC	CAG	GGA	CAG	ACT	880
A	L	G	I	D	Q	G	Q	T	252
ATT	GAA	GCA	ACC	TTT	ACT	AAT	CCT	GTG	898
I	E	A	T	F	T	N	P	V	261
GTT	AGC	ACC	ACC	CAG	TGG	AGT	GCT	CCG	916
V	S	T	T	Q	W	S	A	P	270
CTG	AAC	GTG	GCA	GTA	ACT	TAT	AAC	<u>taa</u>	934
L	N	V	A	V	T	Y	N		278
<div>→←</div>									
ttggctt	<u>tgacaatttt</u>	gtcagcctg	<u>tagttaactga</u>	970					
<div>→</div>									
tataaagcaatccggctg	<u>cgatgtgagtatatatttt</u>	1006							
<div>←</div>									
attatataa	<u>atatattttgtatcgcatg</u>	1036							

10/52

Fig. 10

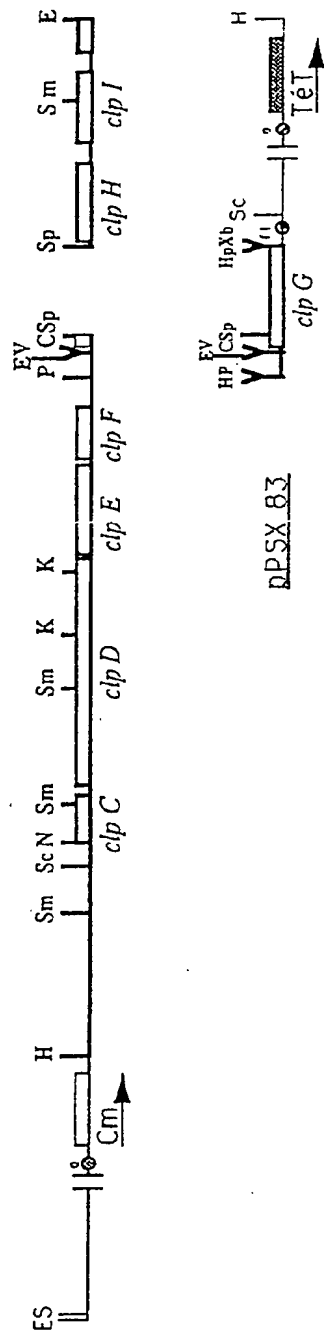


11/52

Fig. 11Fig. 12

12/52

Fig. 13



14/52

Fig.15A

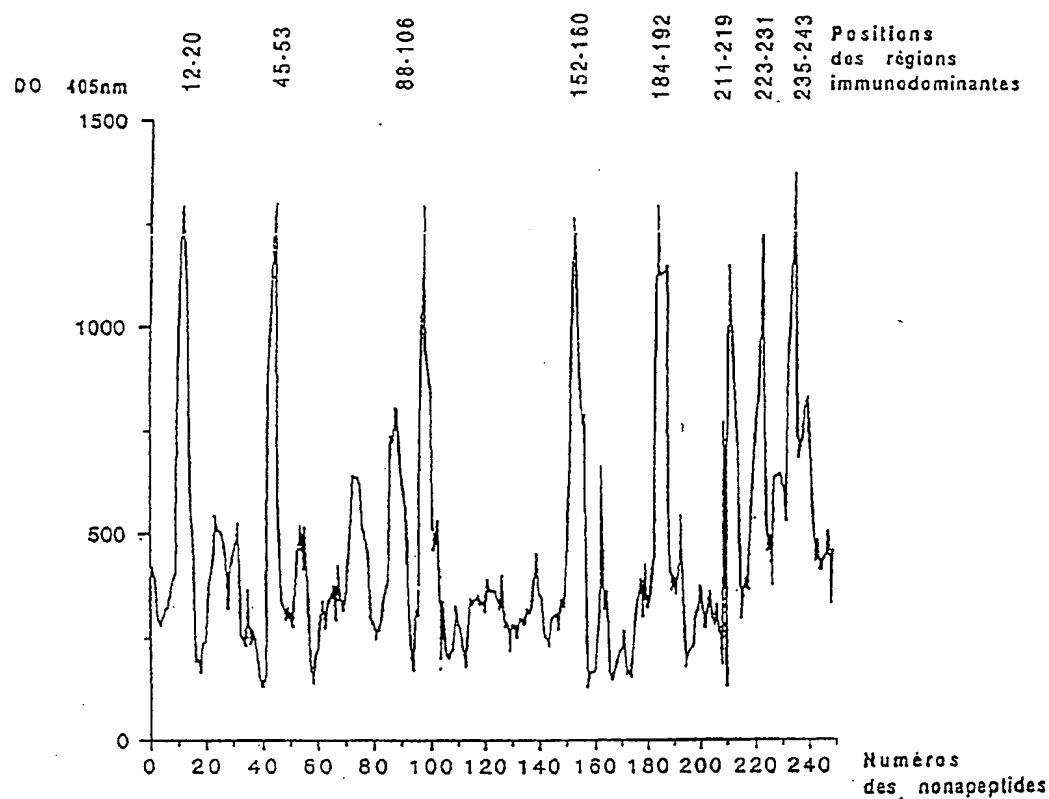


Fig.15B

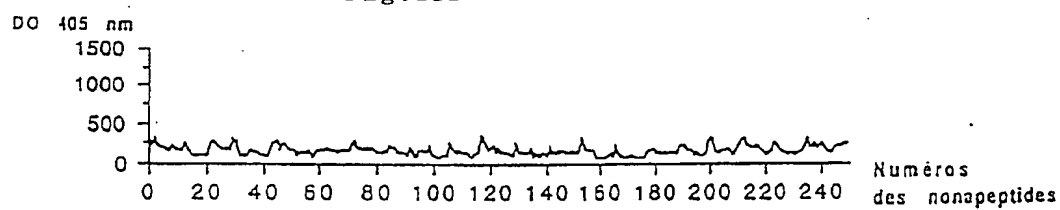


Fig. 16

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

16/52

Fig. 17

WTTGDFNGSFDMNGTTTADAYKDKWEWMVGGALSFNNTIKEMTGDSKLLTTQSEPAP

LLGRTKEAFAASIVGVGAIP⁸³LI⁹¹AFSDYEGNGVALQSSGDNGKGFELPMKDD

FSDYEGNGV (S1)

145 153 156 164
 | | | |
 SGNNLGSVKVNVTAGLFSYSEISTGLVGITSVASGDNTSIYYGGLVSPAIRA
 (N2) ASGDNTSIY GLVSPAIRA (S1)

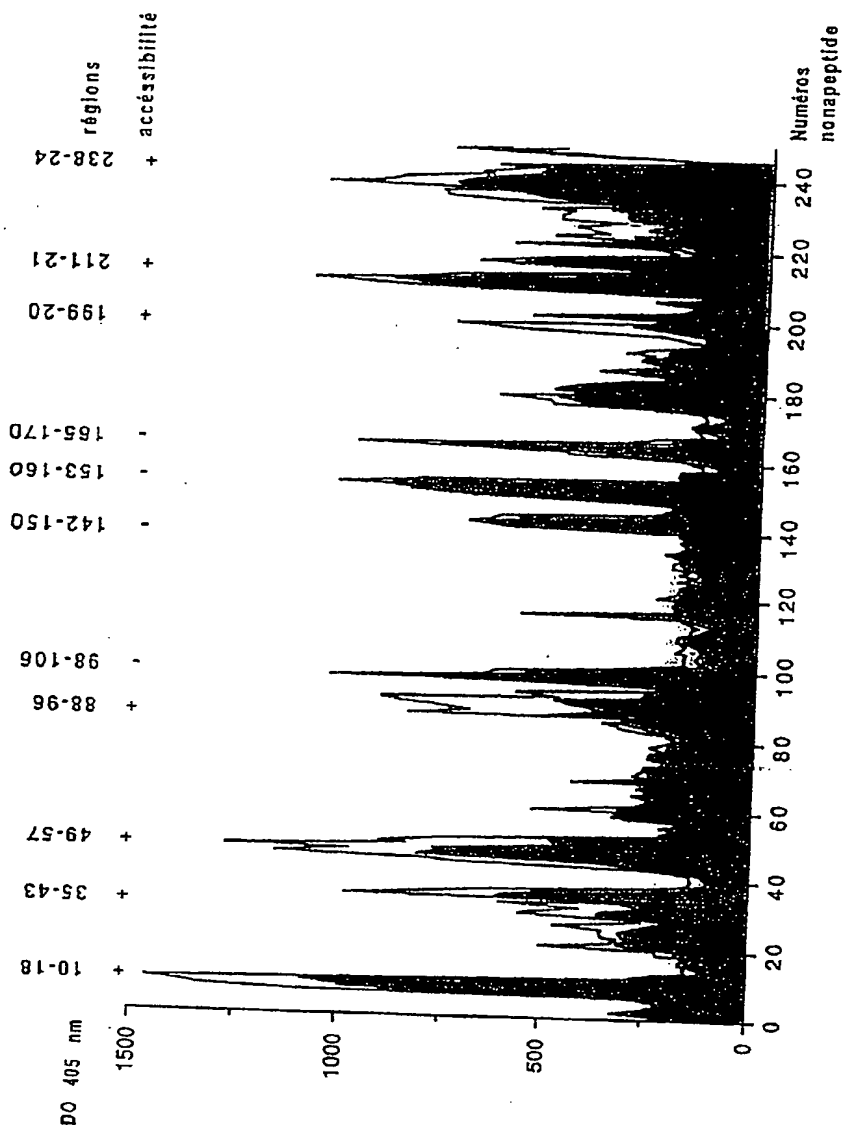
176 196
GKDAASAVSKFGNYNHTQLLGQLQAVNPAGNRGQVNKNSAVSQ

(S1) GNYNHTQLL QAVNP NAGN (N1)
(N1) TQLLGQLQA
QAVNP NAGN (N2)

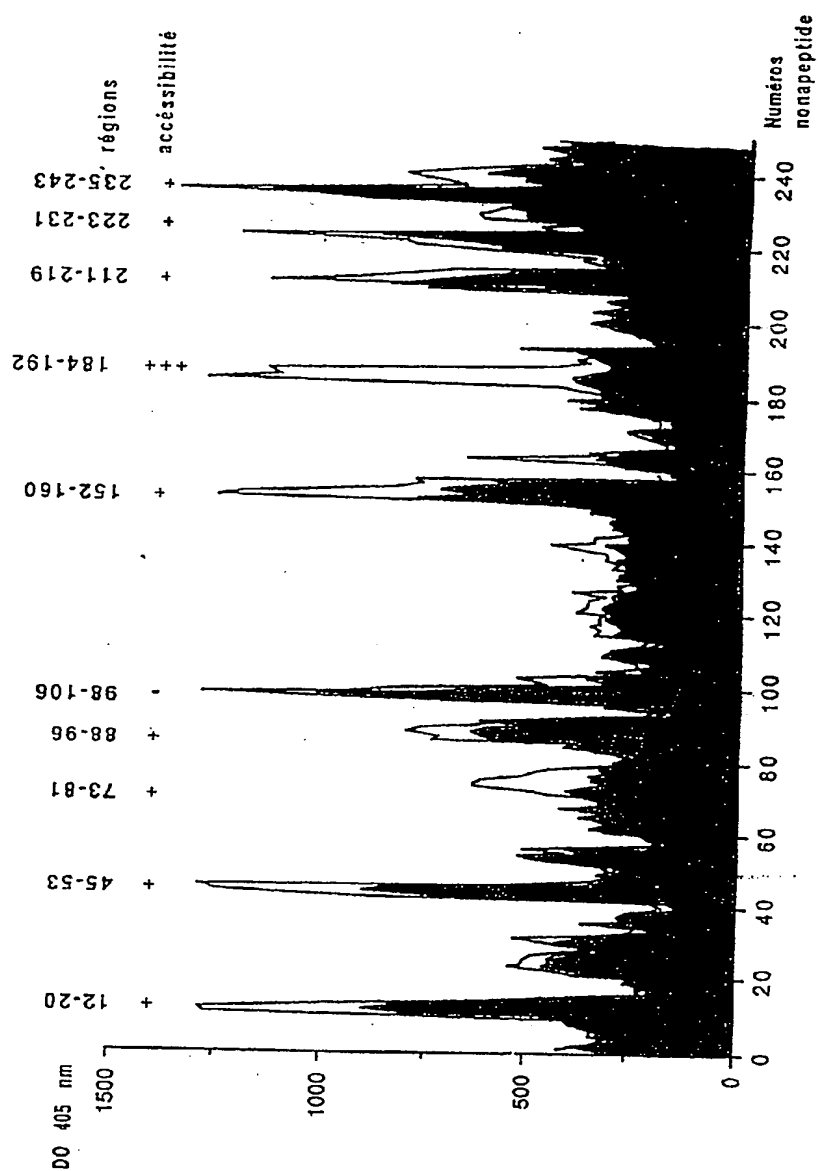
NMVMTTGDVIASSYALGIDQGQTEATFTNPVWSTTQWSAPLNNAVVTYN...
 235 243
 TFTNPVWST (N1)

17/52

Fig.18 (a)

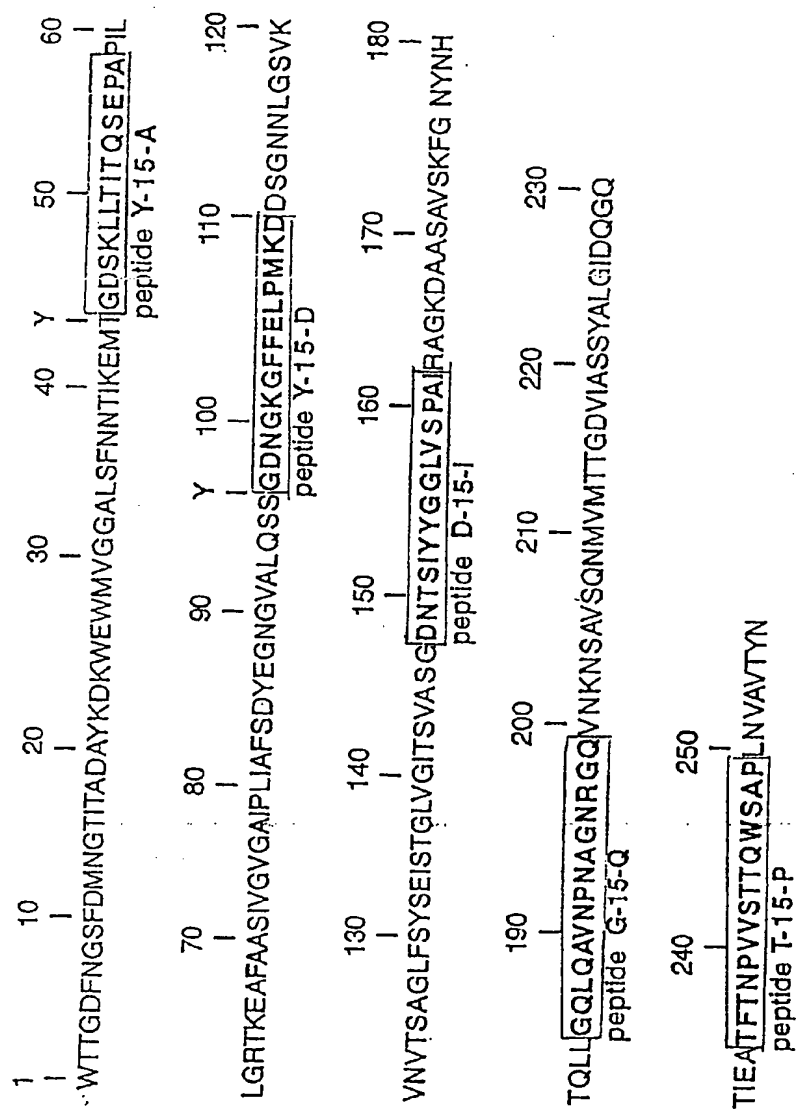


18/52

Fig.18 (b)

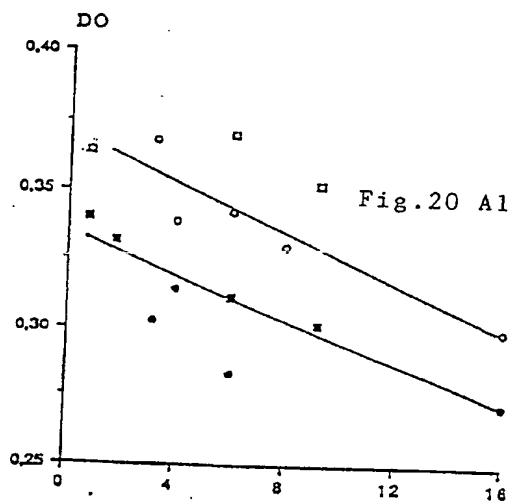
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

19/52

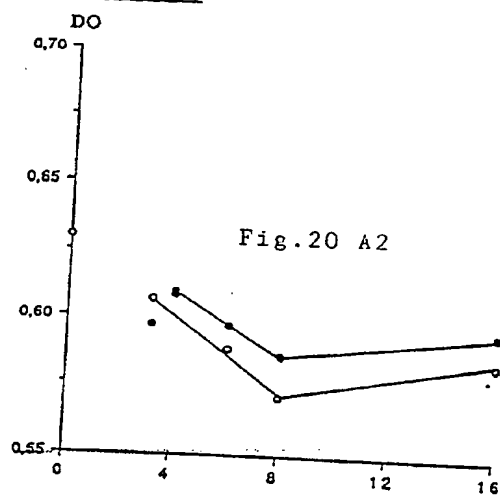
Fig. 19

20/52

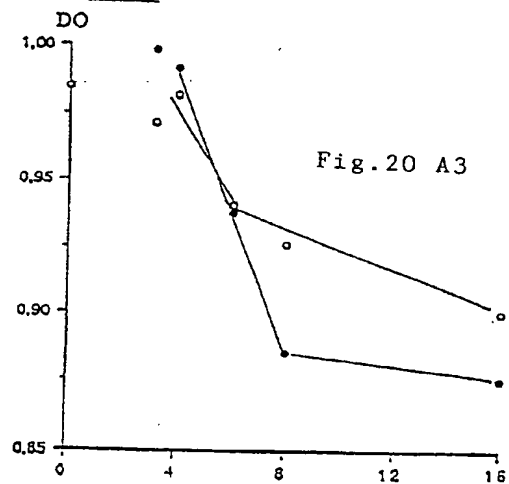
antipeptide D15T
(1/16000)



antipeptide Y15D
(1/32000)



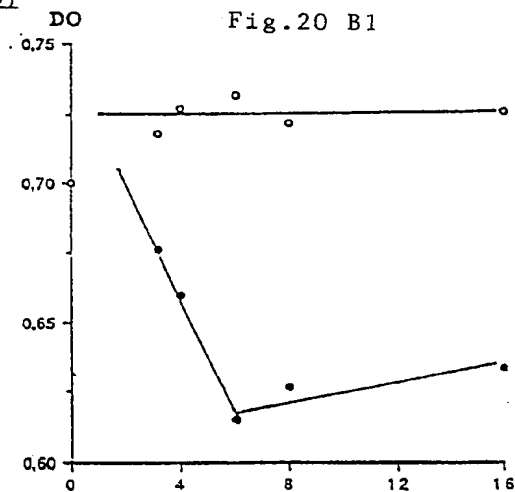
antipeptide Y15A
(1/10000)



21/52

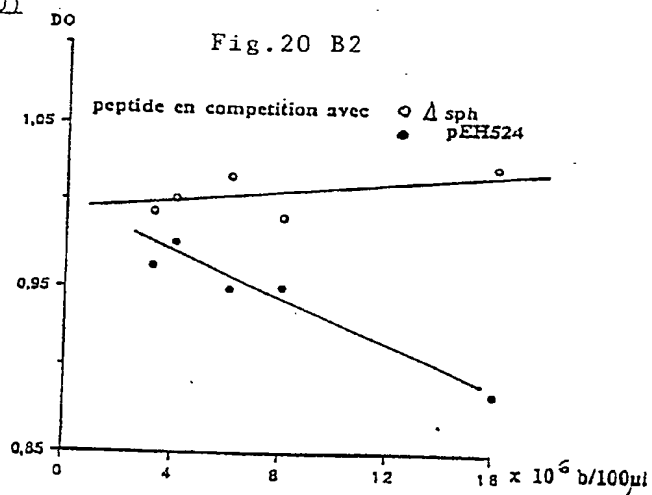
antipeptide T15P
(1/8000)

Fig.20 B1

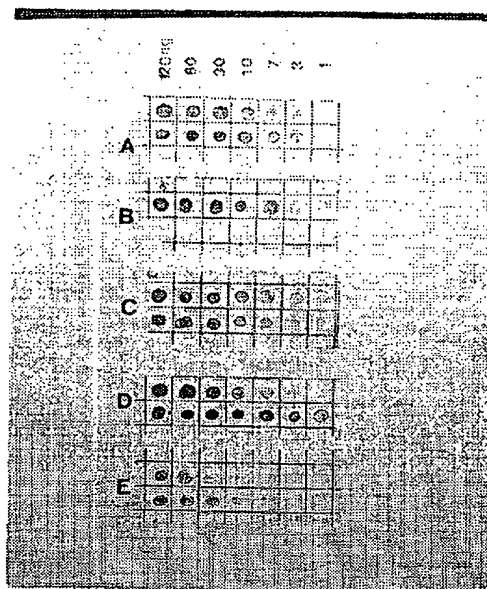


antipeptide G15Q
(1/16000)

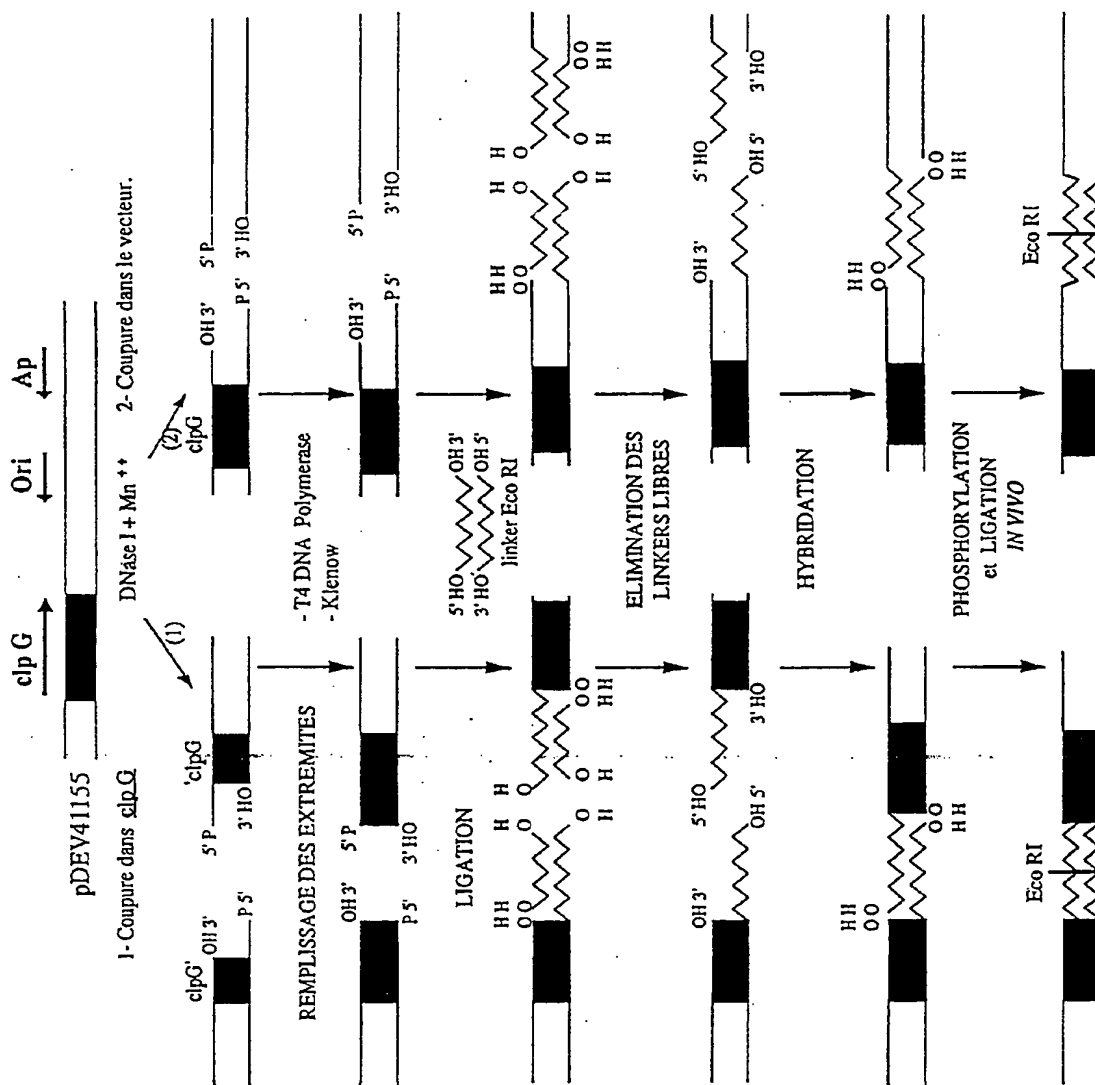
Fig.20 B2



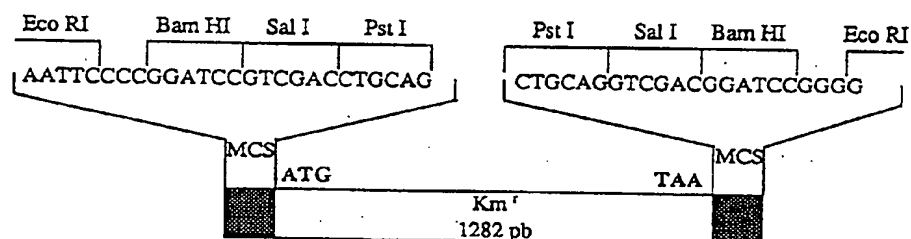
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Fig.21

23/52

Fig. 22

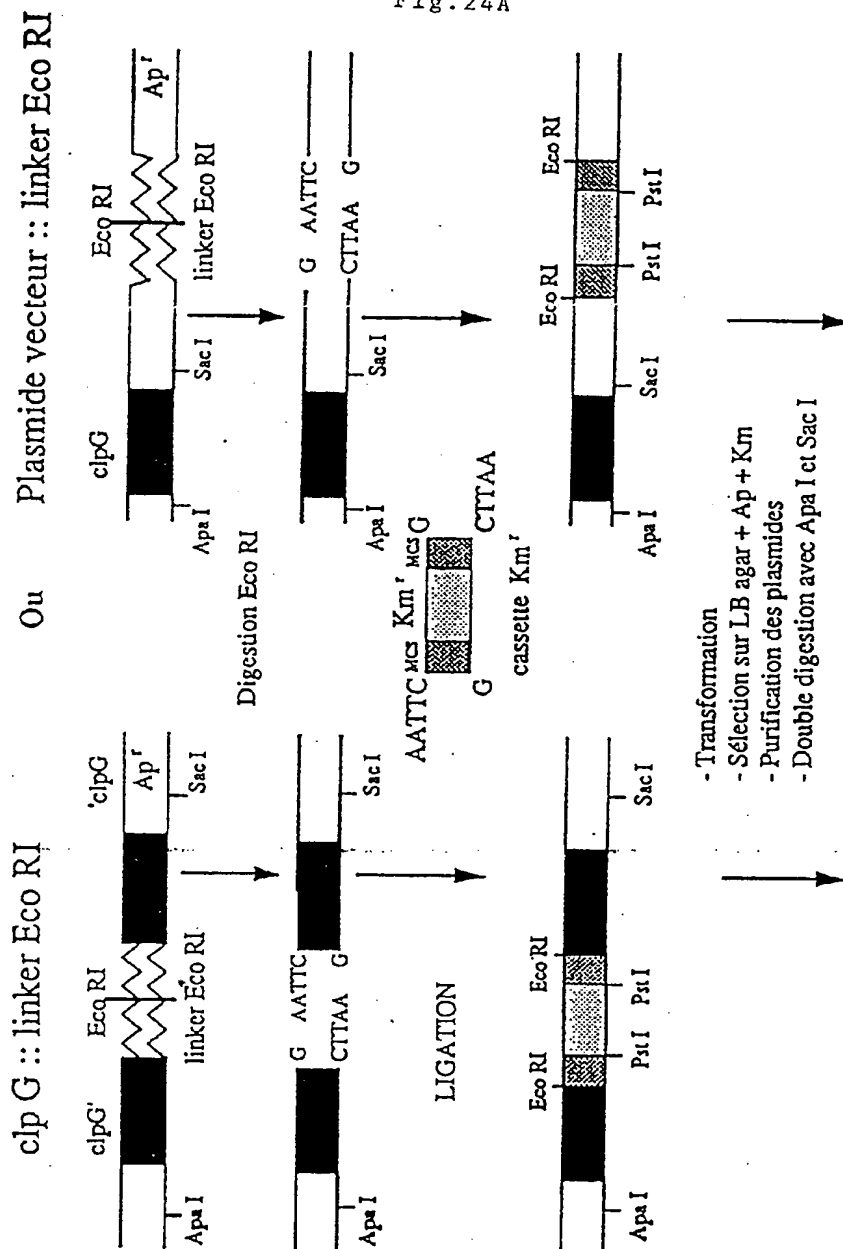
24/52

Fig.23

Cassette Km^r avec ses sites de restriction multiples et symétriques (MCS).

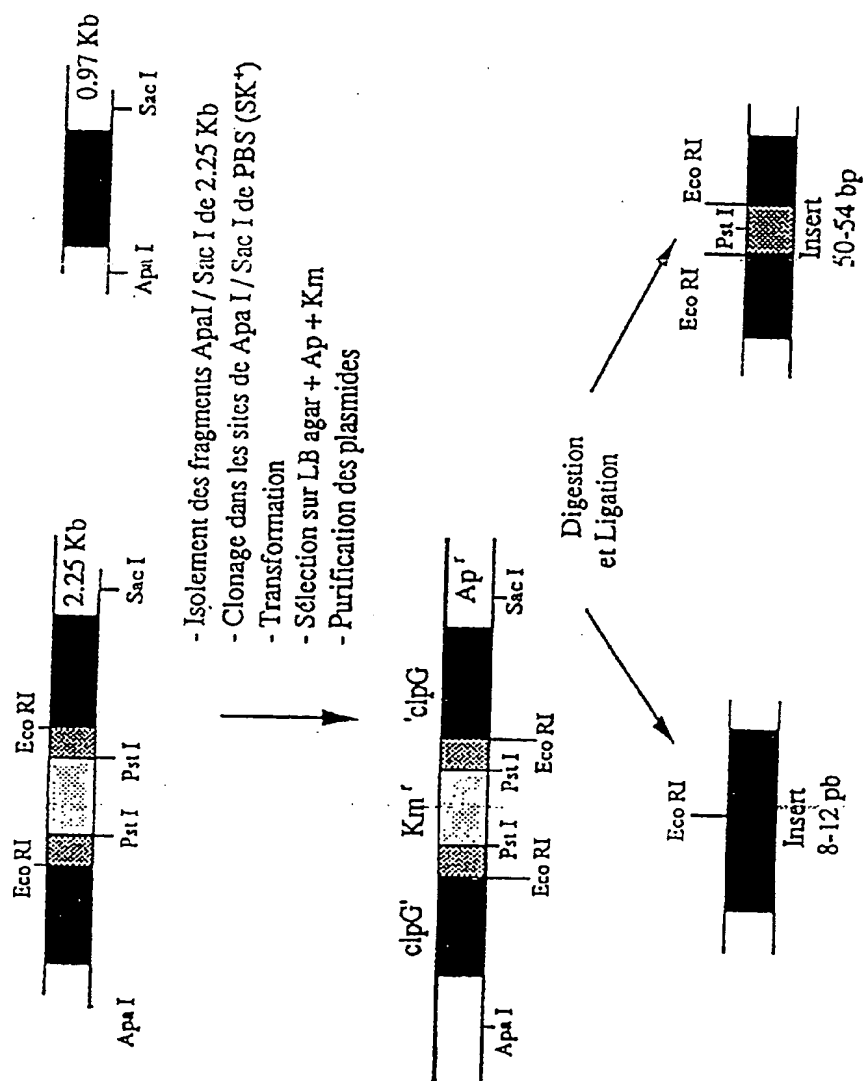
25/52

Fig. 24A



26/52

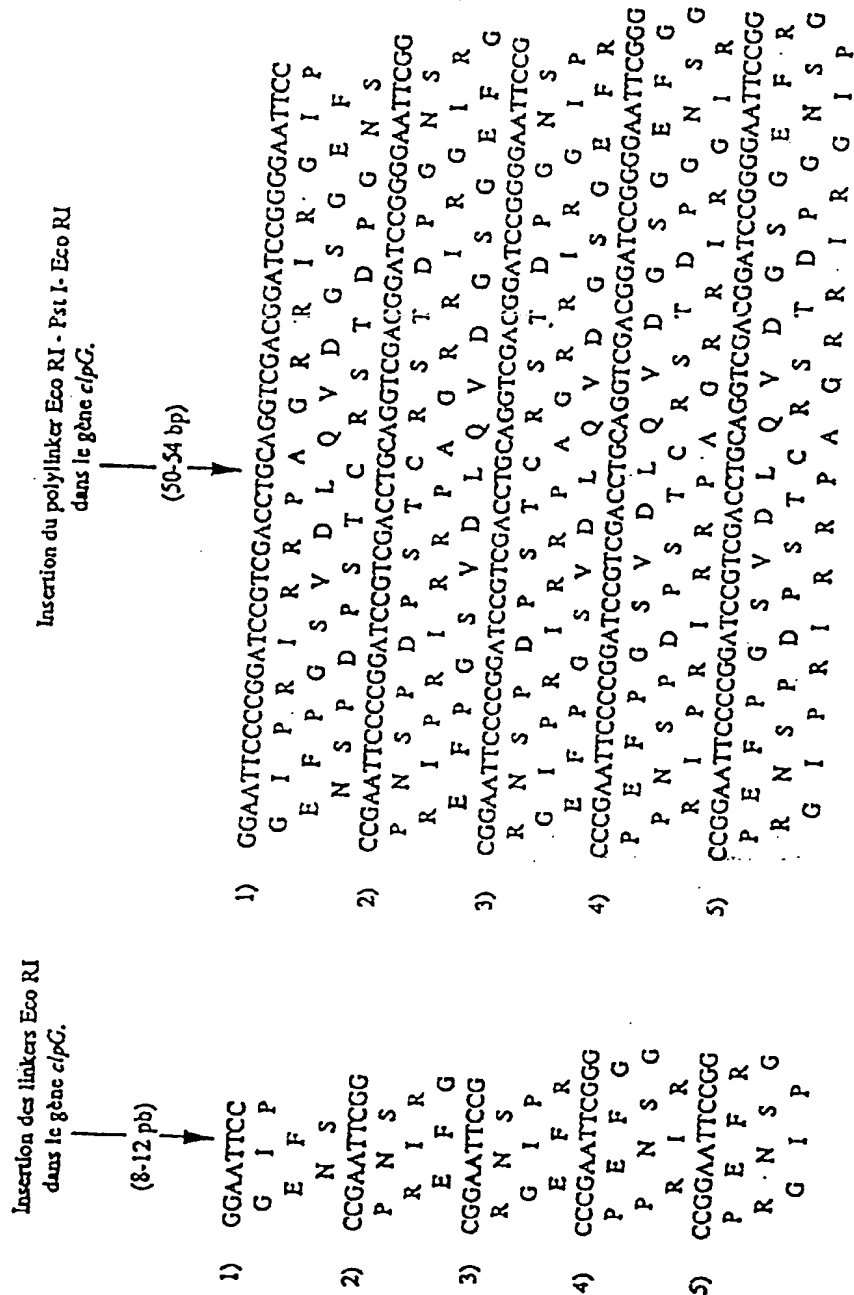
Fig. 24B



- Isolement des fragments *Apa*I / *Sac*I de 2.25 Kb
- Clonage dans les sites de *Apa*I / *Sac*I de PBS (SK⁺)
- Transformation
- Sélection sur LB agar + *Ap* + *Km*
- Purification des plasmides

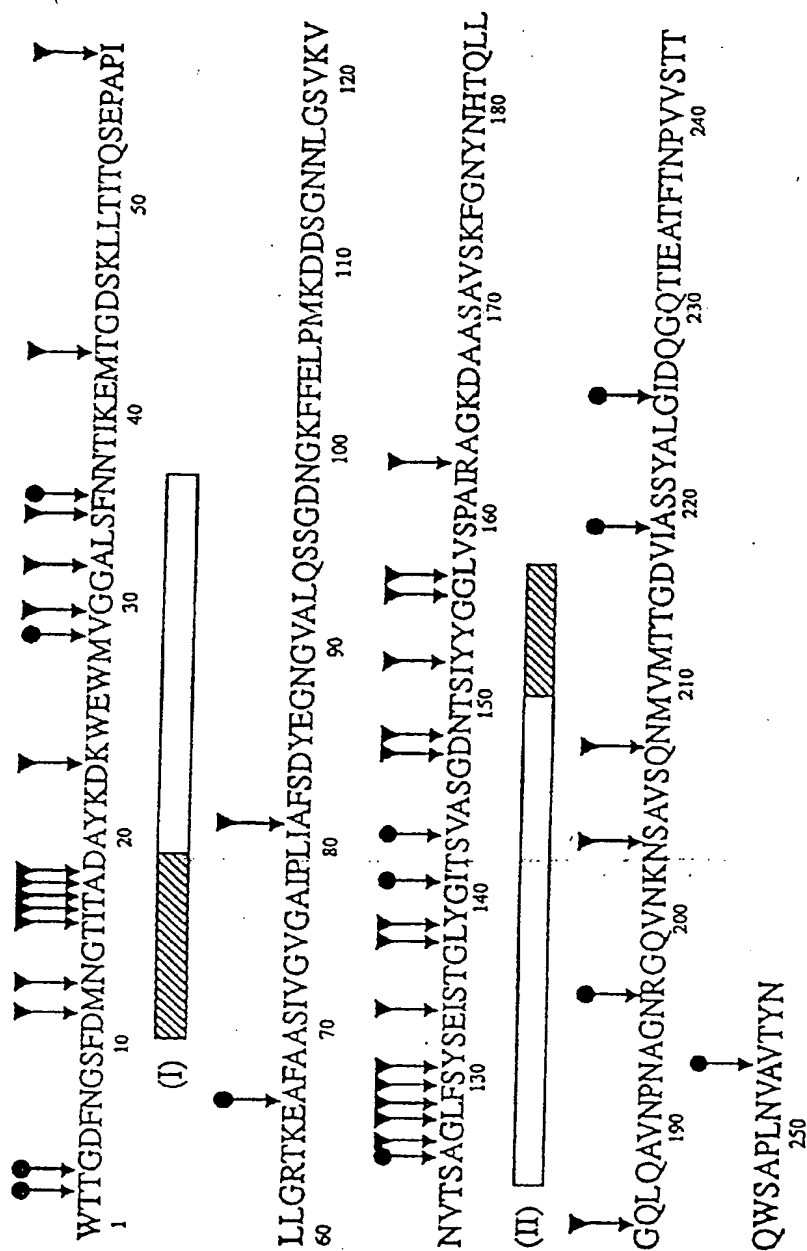
27/52

Fig. 25



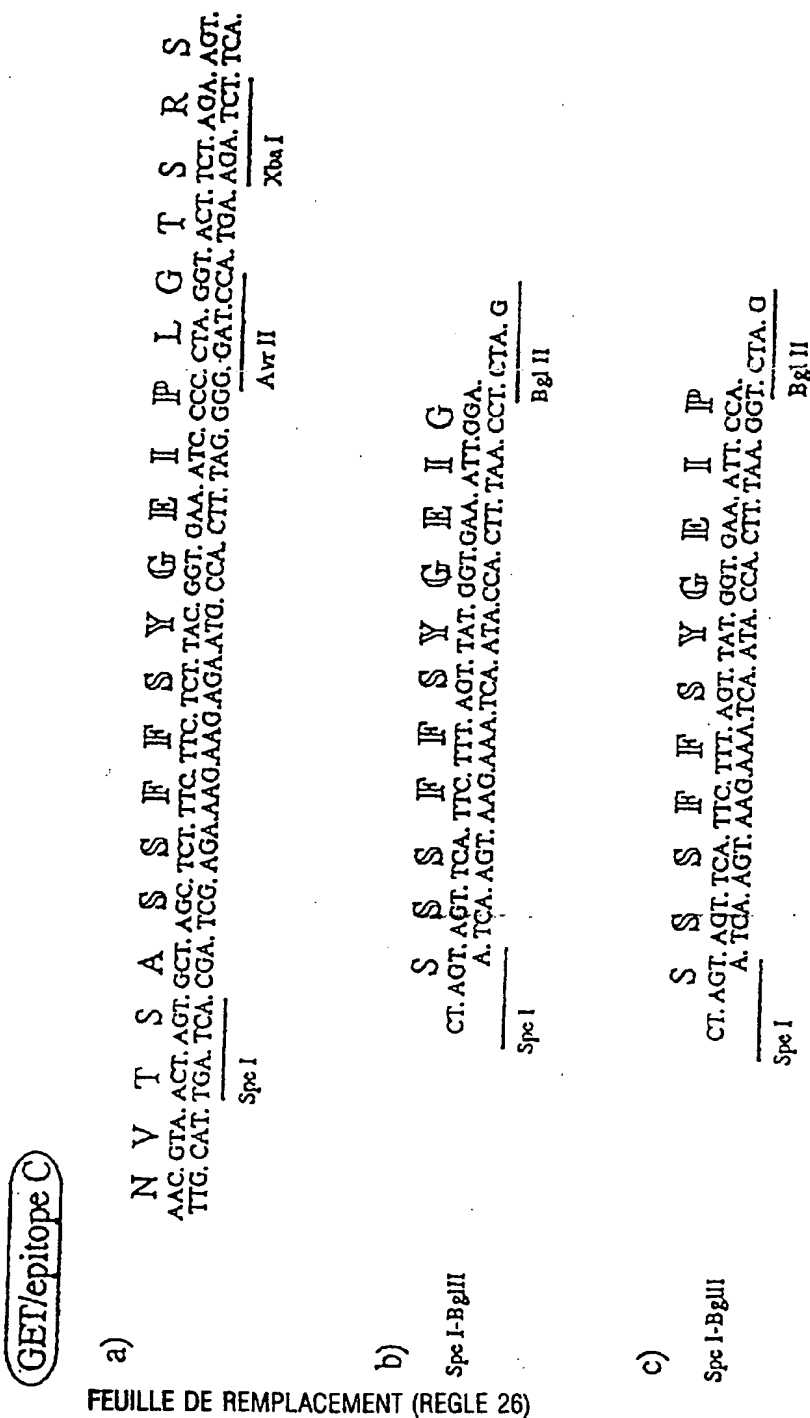
28/52

Fig. 26



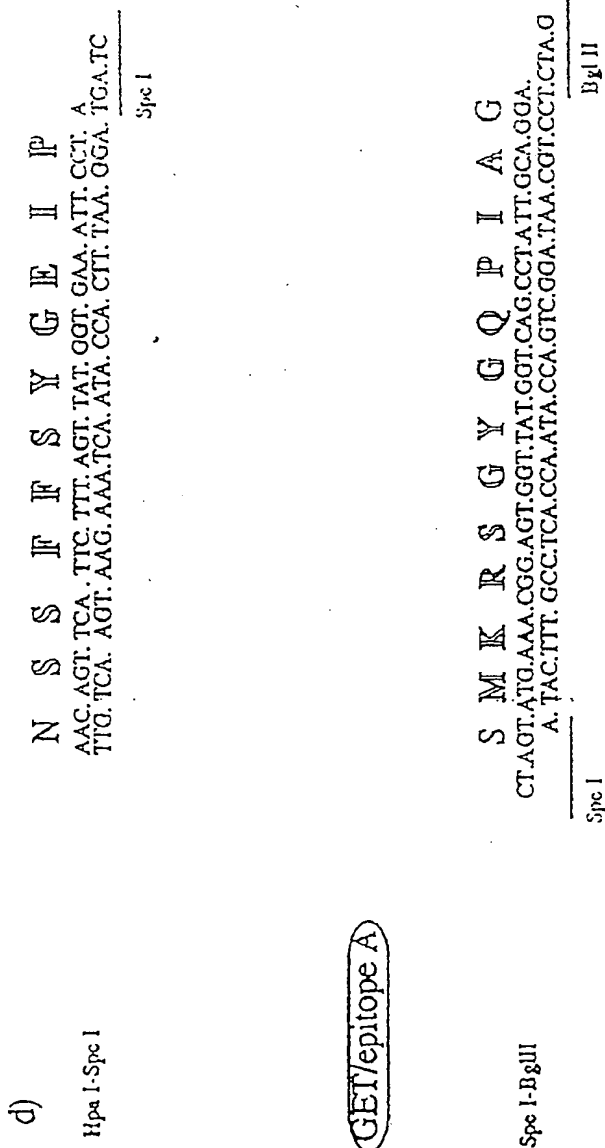
29/52

Fig.27 (a)



30/52

Fig.27 (b)



31/52

Fig.27 (c)

POLIO

e)

Spe I-Bgl II

S D N P A S T T N K D K G
 CT. AGT. GAT. AAC. CCT. GCT. AGC. ACT. ACA. AAT. AAA. GAT. AAA. GGA.
 A. CTA. TTG. GGA. CGA. TCG. TGA. TGT. TTA. TTT. CTA. TTT. CCT. CTA. G
 Spe I Bgl II

f)

Hpa I-Spe I

A V N P A S T T N K D K T S A
 G. GCA. GTT. AAC. CCT. GCA. AGT. ACT. ACA. AAT. AAA. GAT. AAA. ACT. AGT. GCG. G
 C. CGT. CAA. TTG. GGA. CGT. TCA. TGA. TGT. TTA. TTT. CTA. TTT. TGA. TCA. CGC. C
 Hpa I Spe I

32/52

Fig.27 (d)

FMDV

g)

Hpa I-Spc I

N Y K Q K I I A P A Q K
 AAC.TAT. AAA.CAG.AAA.ATT. ATT. GCA. CCI: GCA. CAG.AAA. A
 TTG. ATA. TTT. GTC. TTT. TAA. TAA. CGI. GGA. CGI. GTC. TTT. TGA. TC
 Spc I

ROTA

S I R N W N F D F G L L G
 CT.AGT.ATT.AGA.AAT.TGG.AAC.TTT.GAT.TTT. GGT.CTG.TTA.GGA.
 A.TCA.TAA.TCT.TTA.ACC.TTG.AAA.CTA.AAA.CCA.GAC.AAT.CCT.CTA.G
 Spc I Bgl II

Spc I-BglII

33/52

Fig. 28

110120

F E L P M K D D S G N N L G S V K

TTT GAA TTG CCC ATG AAA GAT GAT AGT GGA AAT AAT CTC GGT AGC GTA AAA

123	REGION VARIABLE 2	151
-----	-------------------	-----

-130140150

V N VTSAGLF S Y SEIST G L V GI T S VAS GDNTS

GTT.AATTAT.AGTGGT.TTA.GTTACT.TCT

V N mutant 1

GTT.AAC*

Hpa I

V N 10 aa T S mutant 2

GTT.AAC* ACT.AGT*

Hpa I Spe I

V N 16 aa G L V mutant 3

GTT.AAC* GGA.CTA.GTT

Hpa I Spe I

V N 21 aa T S mutant 4

GTT.AAC* ACT.AGT*

Hpa I Spe I

V N 10 aa T S 9 aa T S mutant 5

GTT.AAC* ACT.AGT* ACT.AGT

Hpa I Spe I Spe I

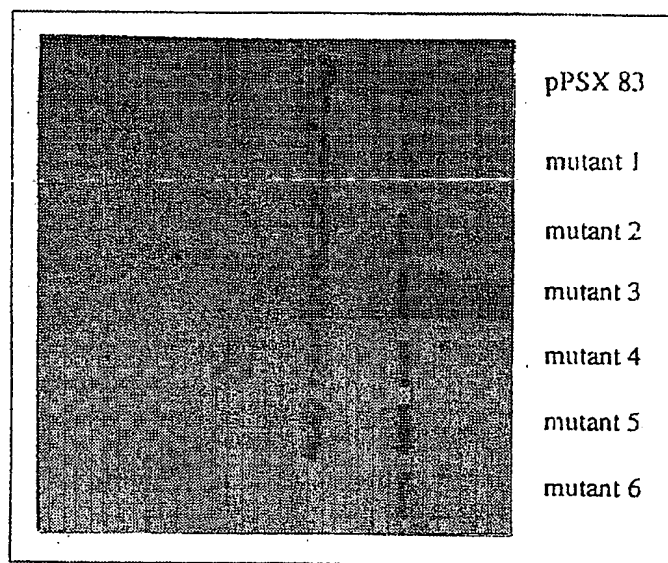
V N 10 aa T S mutant 6

GTT.AAC* ACT.AGT*

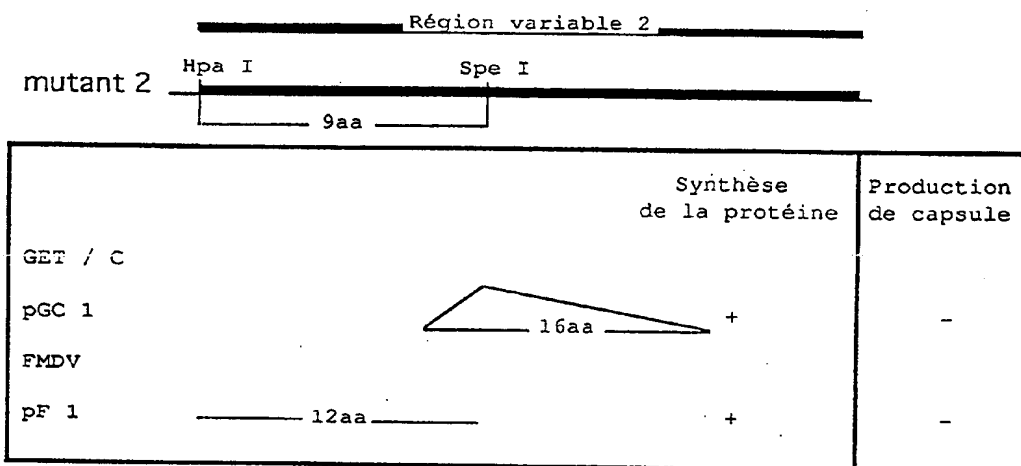
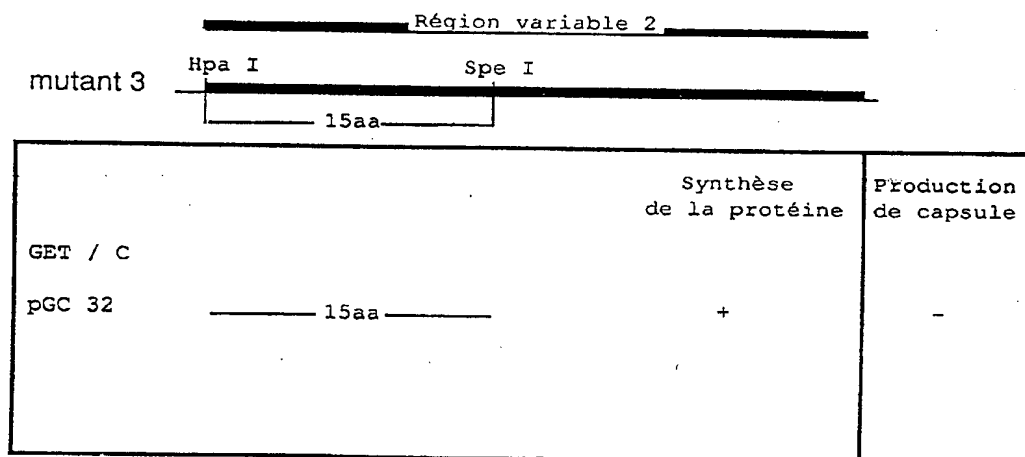
Hpa I Spe I

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Fig.29



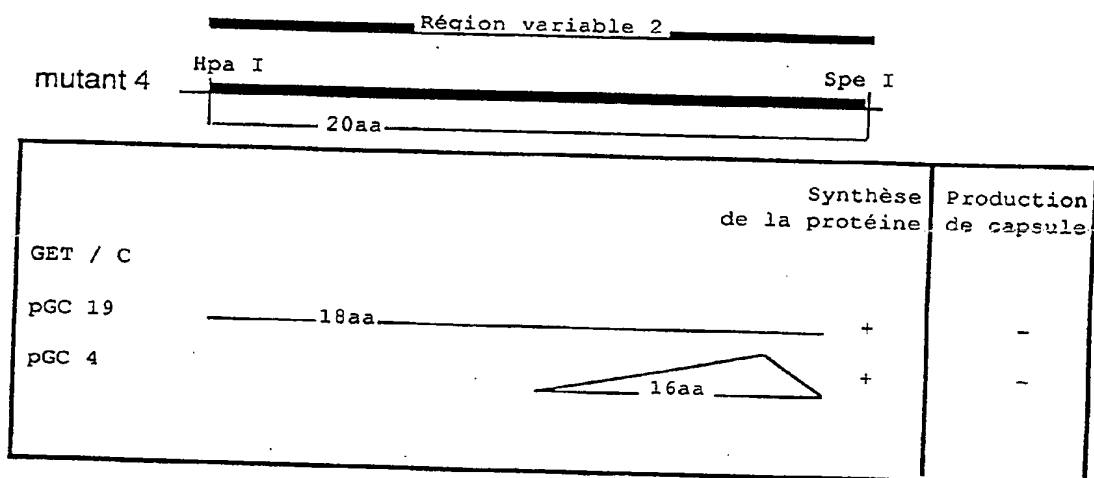
35/52

Fig.30 (a)**a****b**

36/52

Fig.30 (b)

C



d

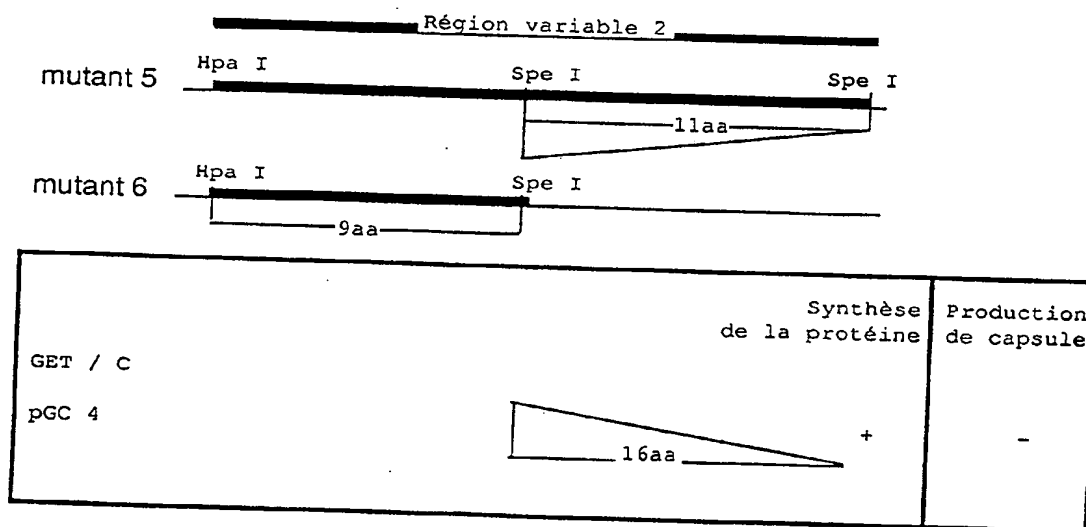
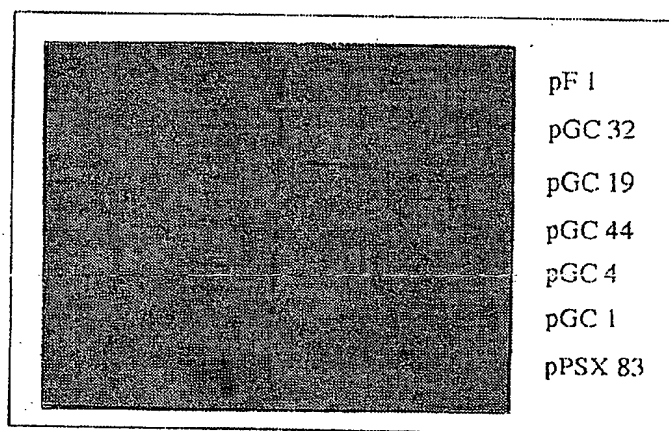


Fig. 31



T Q L L G
ACA CAA TTG GTG GGC

186	REGION VARIABLE 3	221
-----	-------------------	-----

Q L Q A V N P N A G N R G Q V N K N S A V S Q N M V M T T G D V I A S S
CAG.CTT GTA.AAC GGA.CAA.GTA AAT.AGT GGT.GAT.GTA

* E L ——— 11aa ——— G L V
*GAG.CTC
Sac I
GGA.CTA.GTA
Spe I

mutant 7

V N ——— 11aa ——— * T S
*GTT.AAC
Hpa I
*ACT.AGT
Spe I

38/52

mutant 8

* T S ——— 10aa ——— G D L
*ACT.AGT
Spe I
*GGA.GAT.CTA
Bgl II

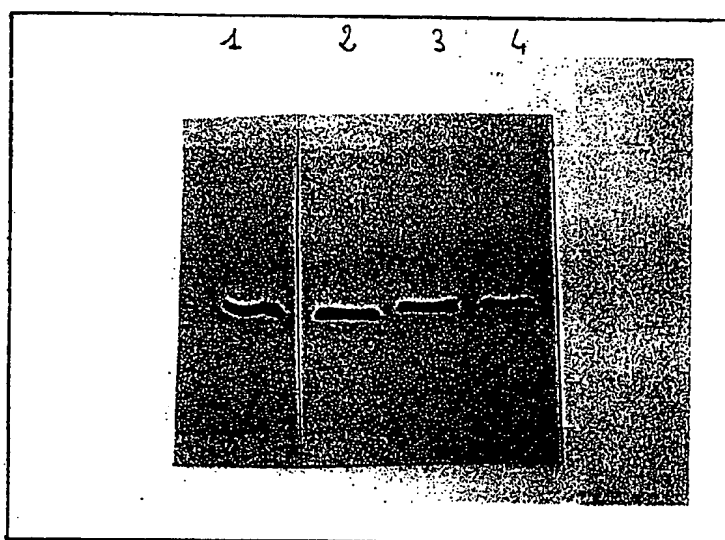
mutant 9

Y A L G I D Q G Q T I
TAC GCA CTT GGT ATT GAC CAG GGA CAG ACT ATT

230

39/52

Fig. 33



40/52

Fig.34**a**

Région variable 3

Hpa I Spe I mutant 8

11aa

		Synthèse de la protéine	Produc- tion de capsule	Accessi- bilité de l'épitope
GET / C GP 684	10aa	+++	+++	ND
POLIO P688	10aa	++	++	+/-
FMDV F681	12aa	++	++	+

b

Région variable 3

Spe I BgI II mutant 9

10aa

		Synthèse de la protéine	Produc- tion de capsule	Accessi- bilité de l'épitope
GET / C GP 105	10aa	+++	+++	ND
GP 103	10aa	+++	+++	+
POLIO P 101	12aa	+++	+++	+/-

Fig. 35

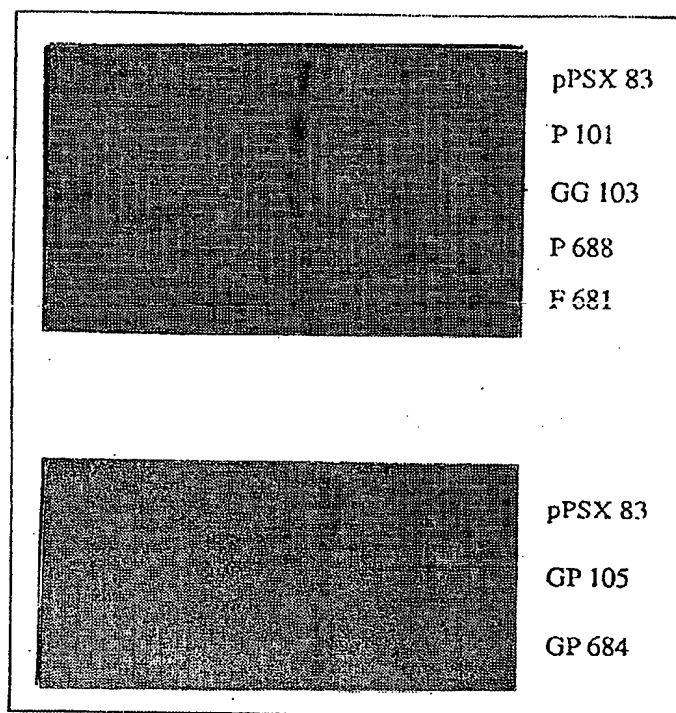


Fig. 36

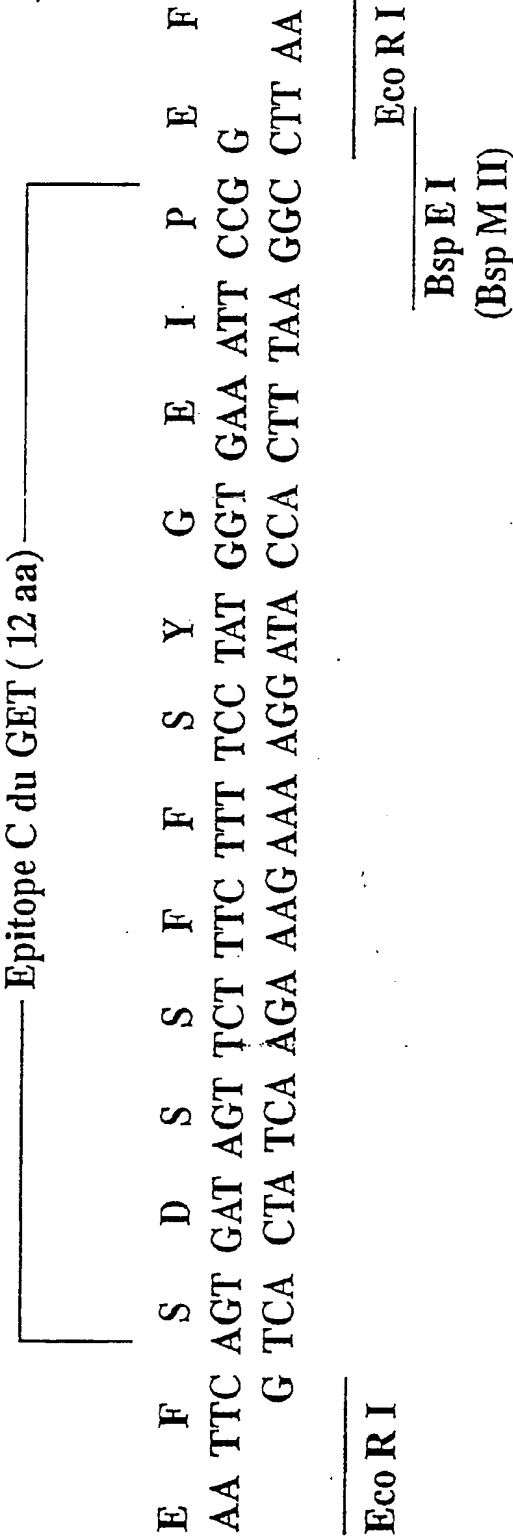
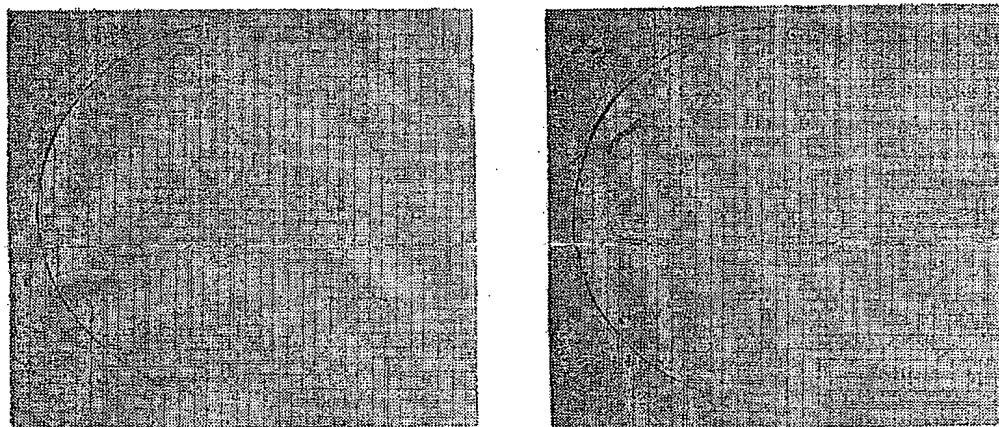


Fig.37

A



B

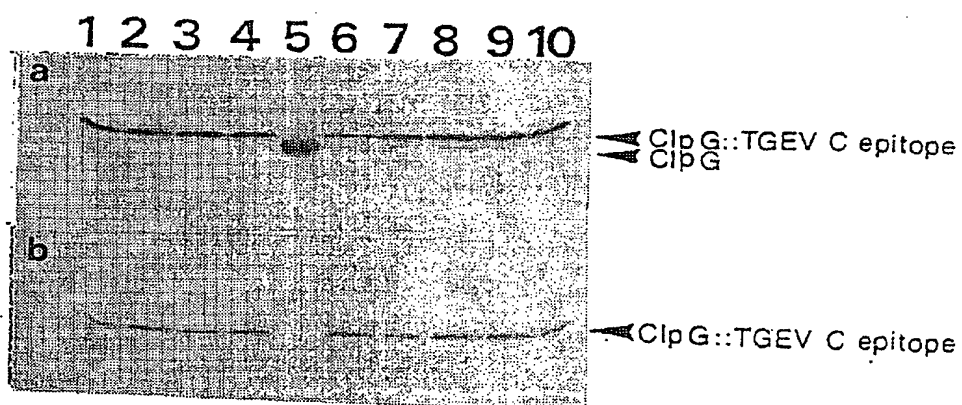
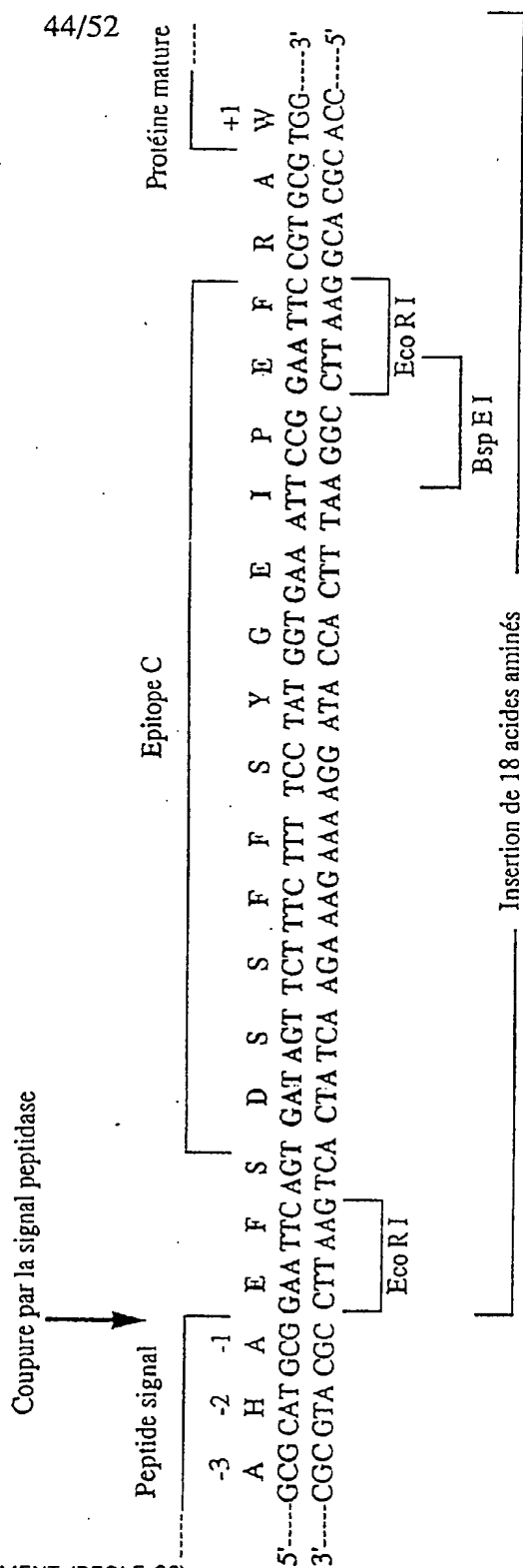


Fig. 38



45/52

Fig.39A

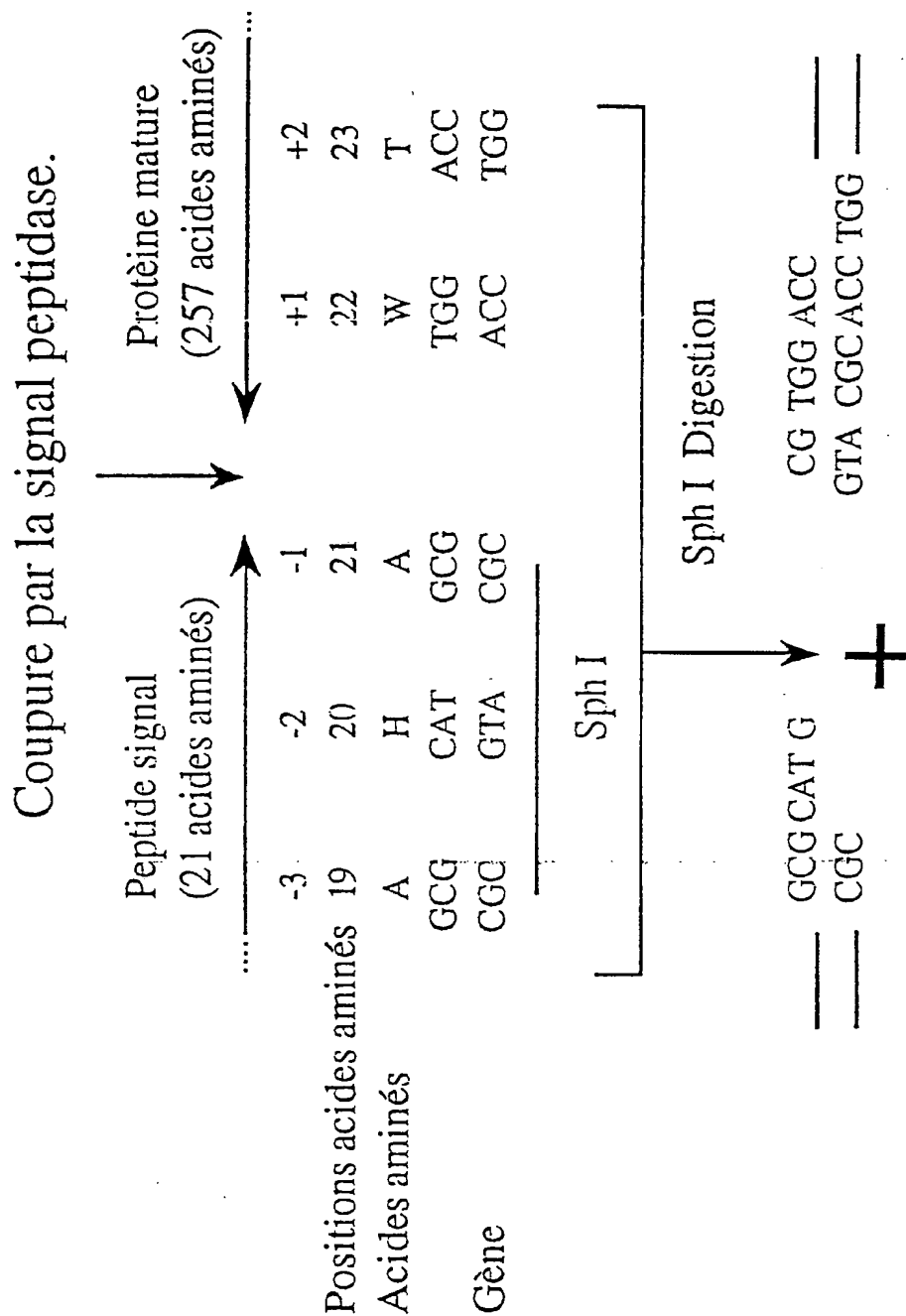
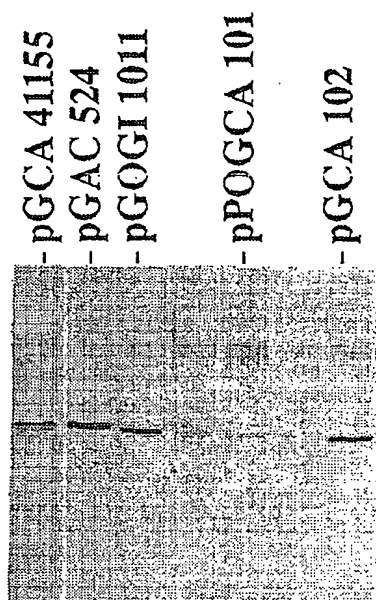


Fig. 40

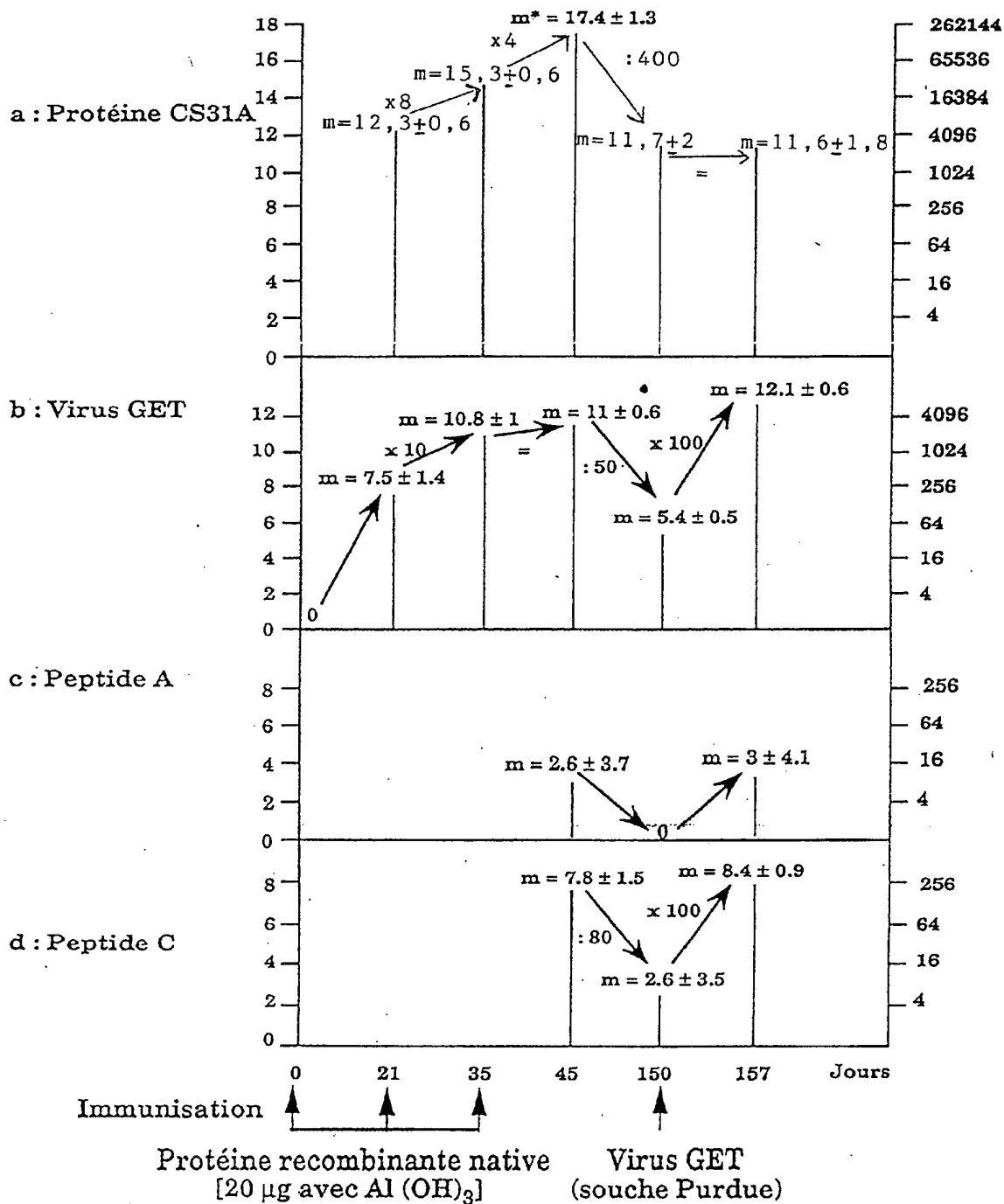


48/52

Fig. 41

Log₂ de l'inverse de la dilution des anticorps donnant une DO > 0.3

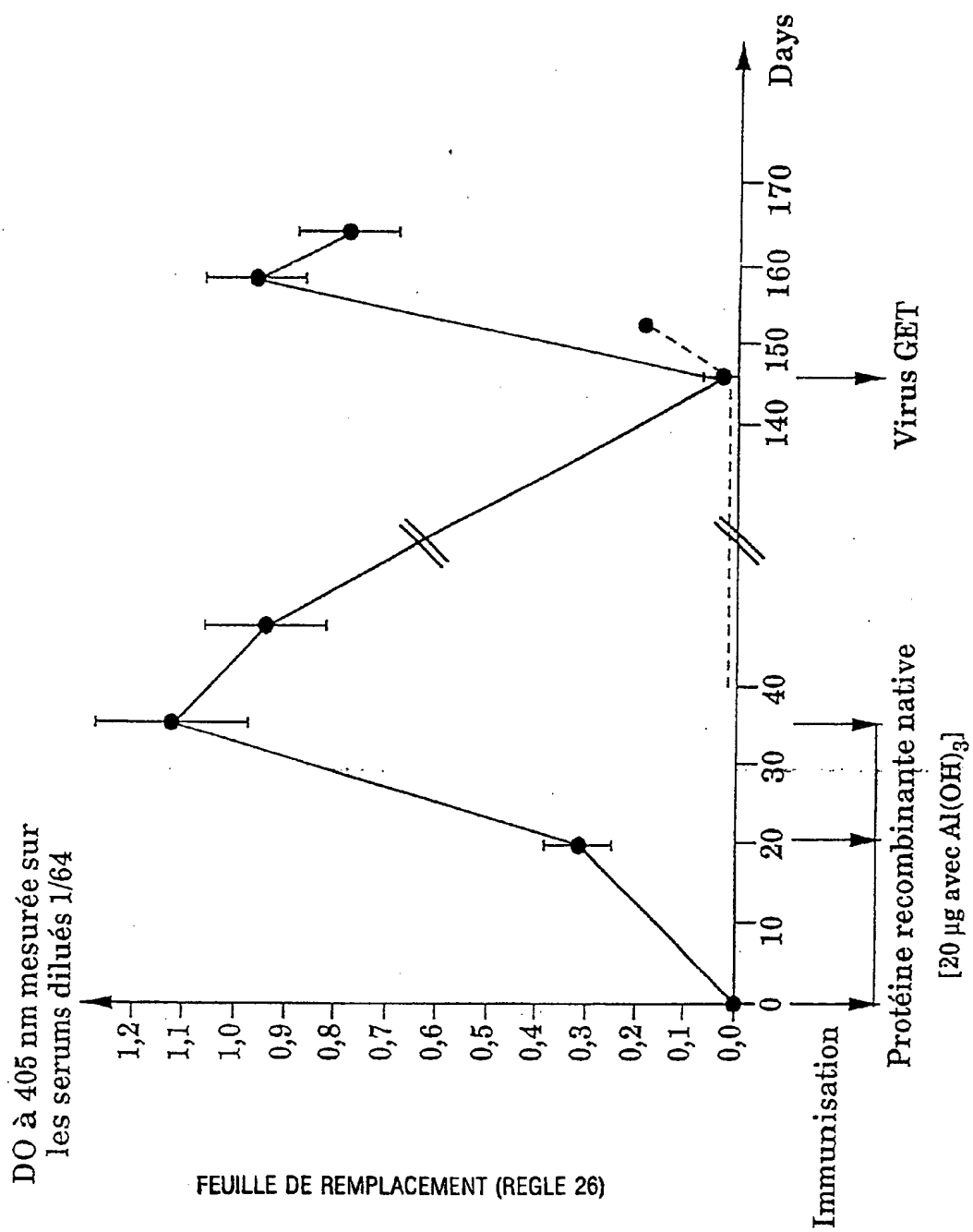
Inverse de la dilution des anticorps donnant une DO > 0.3



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

49/52

Fig. 42

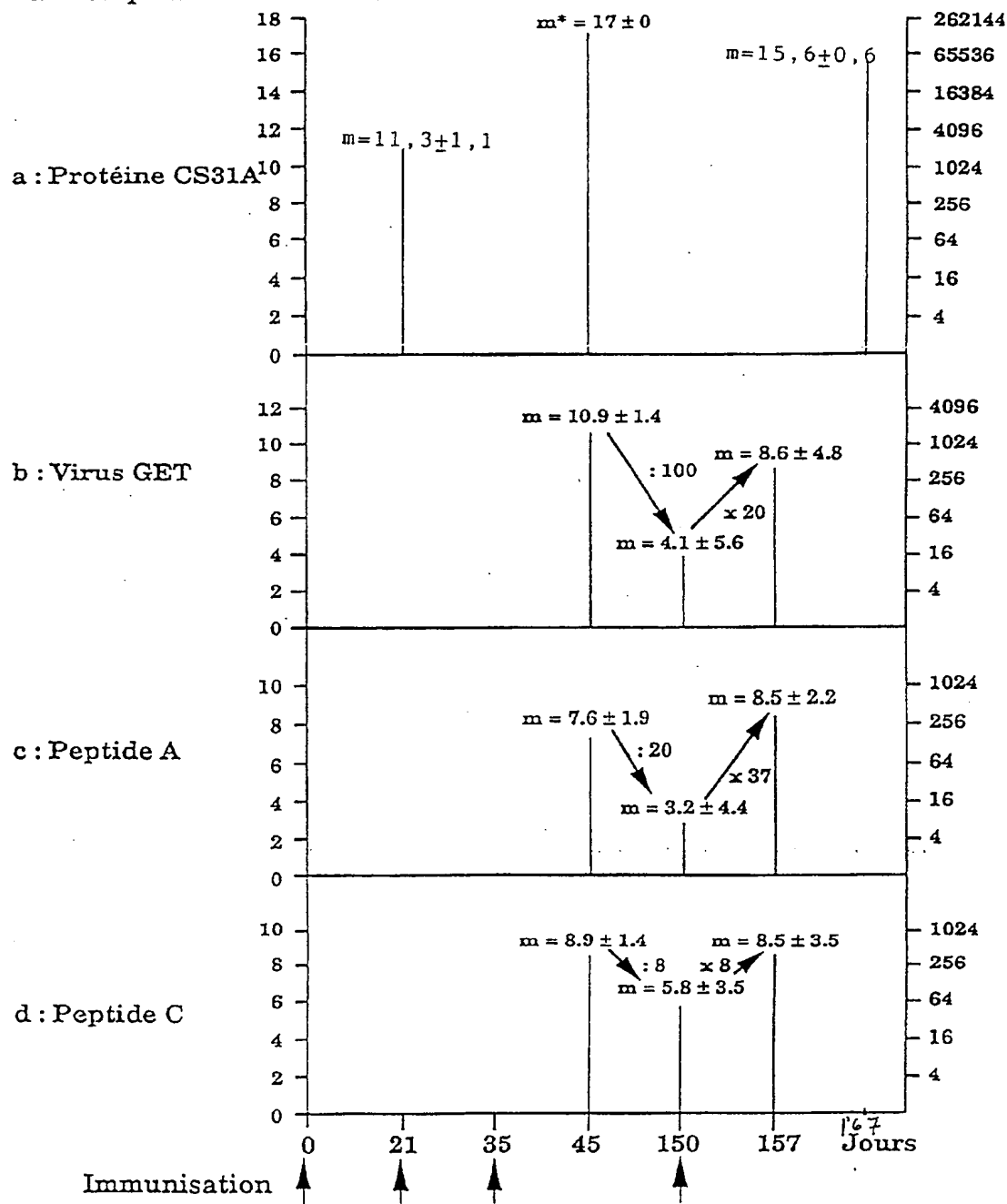


50/52

Fig. 43

Log₂ de l'inverse de la dilution des anticorps donnant une DO > 0.3

Inverse de la dilution des anticorps donnant une DO > 0.3



Protéine recombinante dénaturée
[20 µg with AIF]

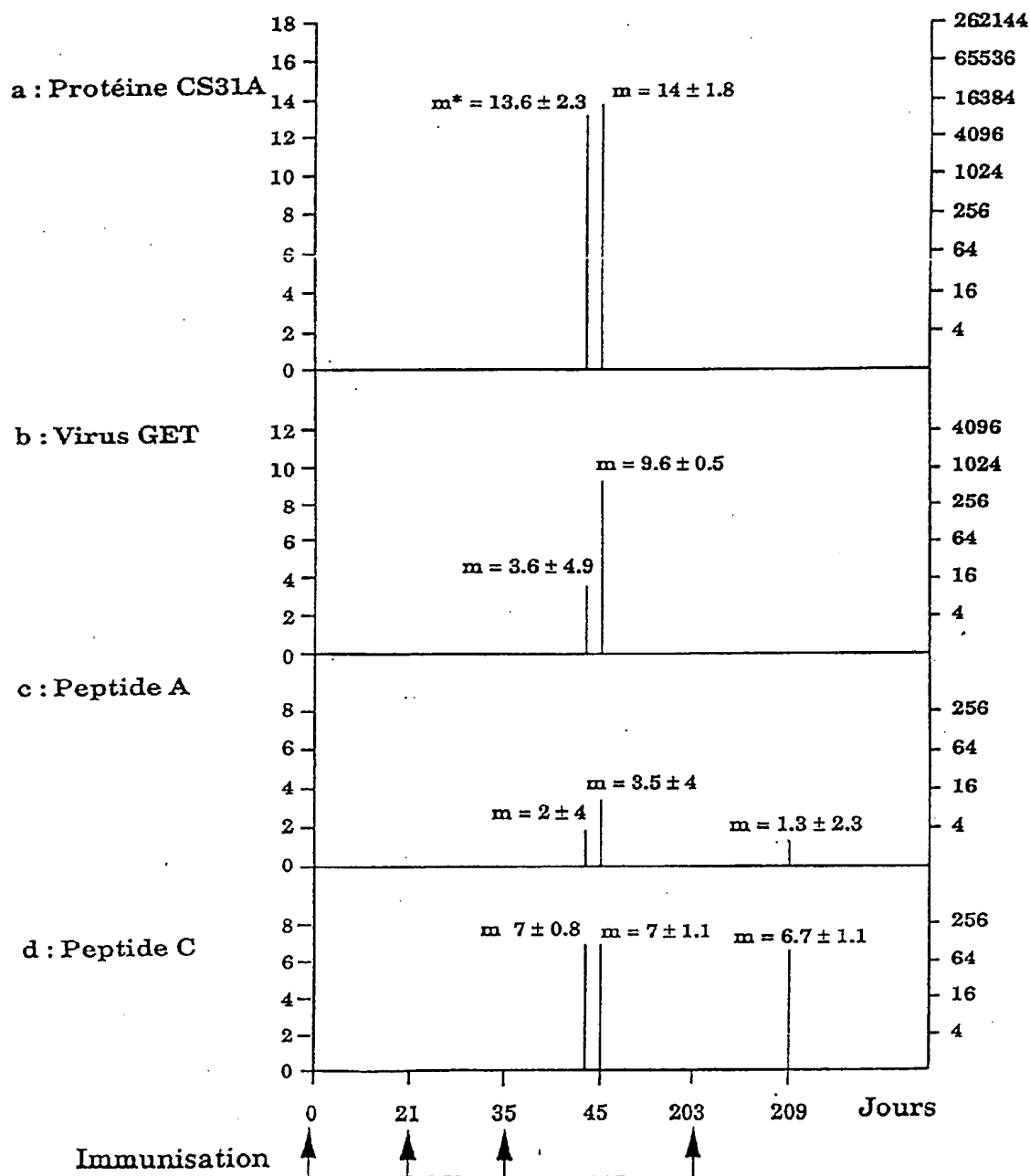
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

51/52

Fig. 44

Log₂ de l'inverse de la dilution des
anticorps donnant une DO > 0.3

Inverse de la dilution des
anticorps donnant une DO > 0.3



Bactéries recombinantes avec AIF
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

52/52

Fig. 45